

München 195

Untersuchungen über die
Plasmaclearance von S^{35} -markiertem
Sulfat im tumorkranken Organismus

von

HELMUT BIEBER

Aus Institut und Poliklinik für Physikalische Therapie
und Röntgenologie der UNIVERSITÄT MÜNCHEN

-- R i e d e r - I n s t i t u t --

Direktor: Prof. Dr. H. von B r a u n b e h r e n s

UNTERSUCHUNGEN

ÜBER DIE PLASMACLEARANCE VON S^{35} -MARKIERTEM SULFAT

IM TUMORKRANKEN ORGANISMUS

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Helmut Bieber

aus

München

1959

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Oberarzt Dr. H.W.Pabst
Korreferent: Prof. Dr. H.v.Braunbehrens
Dekan: Prof. Dr. K.Kolle
Tag der mündlichen Prüfung: 28.7.1959

I N H A L T

	Seite
I. DER SCHWEFELSTOFFWECHSEL IM GESUNDEN UND KRANKEN ORGANISMUS	1
II. DIE VERSCHWINDERRATE VON ANORGANISCHEM, S ³⁵ -MARKIERTEM SULFAT	10
M e t h o d i k	10
Grundlagen (S.10) - Versuchsanord- nung (S.13) - Nachweis des Schwe- fels (S.14) - Fehlerquellen (S.26)	
E r g e b n i s s e	30
Tierversuche (S.30) - Untersuchun- gen am Menschen (S.32) - Ausschei- dung (S. 35)	
D i s k u s s i o n	37
Z u s a m m e n f a s s u n g	42
III. LITERATURVERZEICHNIS	44



I.

DER SCHWEFELSTOFFWECHSEL IM GESUNDEN UND KRANKEN ORGANISMUS

Der Gedanke, mittels radioaktiver Indikatoren Aufschlüsse über Stoffwechselvorgänge zu erhalten, die durch bisher übliche Methoden nicht mehr genau erfaßt werden konnten, hat sich in den letzten Jahren auch für das Gebiet der Tumordiagnostik als überaus fruchtbar erwiesen. Seine Anwendbarkeit auf diesen Sektor wird entscheidend beeinflusst von der Möglichkeit, Stoffe zu finden, welche eine selektive Speicherung durch malignes Gewebe erfahren. In erster Linie empfahl sich Radiojod (I^{131}) zur Diagnose von Schilddrüsenkrebs und seinen Metastasen. Neue Erkenntnisse über das pathophysiologische Verhalten der Tumorzellen legten die Einführung von Radiophosphor (P^{32}) nahe. C a s p a r s s o n, v. E u l e r, H e v e s y u. a. hatten bewiesen, daß der vermehrte Phosphorgehalt in rasch wachsendem Gewebe als Folge einer erhöhten Bildung von Nucleinsäuren aufzufassen sei. P a b s t und C r a m e r (1,2,3) zeigten, daß P^{32} in der Lage ist, eine Reihe oberflächlich gelegener Geschwülste einwandfrei zu diagnostizieren. Radioaktives Kalium (K^{42}) wurde auf Grund ähnlicher Überlegungen zur Diagnose von Hirntumoren verwendet; auch über Versuche mit radioaktivem Gallium, Natrium und Arsen wurde berichtet. Maligne Neoplasmen des Gehirns konnten ferner durch radioaktives Dijodfluorescein und I^{131} -markiertes Albumin lokalisiert werden (4). Der Vorteil der genannten Methoden liegt in einer unter Umständen topographisch sehr genauen Lokalisation des malignen Prozesses, ihr Nachteil in dem Umstand, daß methodisch gut nachweisbare γ -Strahler wie Radiojod nur ein beschränktes Anwendungsgebiet besitzen, während ein von malignem Gewebe so hochgradig selektiv gespeicherter Stoff wie P^{32} als weicher β -Strahler im allgemeinen nur bei oberflächlich gelegenen Neoplasmen ohne größere technische Schwierigkeiten nachgewiesen werden kann.

In der vorliegenden Arbeit ist der Versuch unternommen worden, ein weiteres Element, radioaktiven Schwefel ($_{16}S^{35}$), als träger-

freies Sulfation zur Diagnostik maligner Prozesse heranzuziehen. Im Gegensatz zu den bisher verwendeten Stoffen und Methoden ging es dabei um die Beantwortung der Frage, ob es die Anwendung von S^{35} als radioaktivem Indikator gestatte, bei Verdacht auf eine bösartige Geschwulst unter Verzicht auf genauere Lokalisation ganz allgemein das Vorliegen einer solchen nachzuweisen. Die besondere Art dieser Fragestellung ist bedingt durch die physikalische Eigenart des verwendeten Isotops: S^{35} emittiert eine extrem schwache β -Strahlung mit einer Reichweite im Gewebe von nur 0,3mm, die ihren Nachweis durch ein von außen herangebrachtes Zählrohr unmöglich macht. Es mußte also eine Methode entwickelt werden, die diesem besonderen Umstand Rechnung trägt.

Die Schwierigkeit bei der Suche nach einem Stoff, der eine ideale selektive Speicherung im Krebsgewebe aufweist, rührt von unserer Unkenntnis der genaueren Stoffwechselvorgänge und -veränderungen im Tumor her. Jeder wesentliche Fortschritt in der Diagnostik mit Isotopen ist daher bei Tumoren wie bei keiner anderen Krankheit mit einem Fortschritt in der Aufklärung ihrer Pathogenese gekoppelt. Im Falle des radioaktiven Schwefels kann sich die Wahl auf eine Reihe von Erkenntnissen über den Schwefelstoffwechsel im gesunden und tumor-kranken Organismus stützen, die seit langem in der Literatur diskutiert werden und in letzter Zeit, ebenfalls mit Hilfe radioaktiver Isotope, bestätigt und verschärft werden konnten. Ihrer genauen Erörterung sei zunächst eine kurze Darstellung von Resorption, Speicherung, Umsatz und Ausscheidung des Elements und seiner Verbindungen im Organismus vorausgeschickt.

Die Bedeutung des Schwefels für den Körperhaushalt wird schon durch seine relative Häufigkeit unterstrichen. Mit 0,196% liegt sie noch über der des Chlors (5). Von den Organen weisen Haut, Muskulatur, Herz, Leber, Milz und Skelett einen relativ hohen Schwefelgehalt auf, was für eine starke Beteiligung am Aufbau des Mesenchyms spricht. Besonders muß seine Rolle bei der Bildung der knorpeligen Substanz, des kollagenen Bindegewebes und des Knochens hervorgehoben werden, die durch Arbeiten der letzten Jahre gesichert werden konnte. Somit wird der Schwefel zugleich zu einem wichtigen Faktor bei Wachstums-

prozessen. Es handelt sich dabei in erster Linie um den Einbau von anorganischem Sulfat in das Molekül von Glykoproteiden, besonders der Chondroitinschwefelsäure. Als Bestandteil der Aminosäuren Cystein, Cystin und Methionin kommt dem Schwefel aber auch Bedeutung für den Eiweißaufbau zu. Biologisches Interesse verdient der Schwefelgehalt von Cystein und Glutathion insofern, als die hier auftretende Sulfhydrylgruppe zu den wichtigen Redoxsystemen des Organismus gehört. Schließlich sei noch auf die entgiftende Funktion des Sulfats bei der Ausscheidung von Abbauprodukten aromatischer Aminosäuren bzw. gewisser toxischer Substanzen hingewiesen (Paarung mit Phenol, Kresol, Skatoxyl, Indoxyl u.a.). Der Gehalt des Vollblutes an Sulfat beträgt insgesamt 3,8 - 5,0mg % (5). Schwefel kann in anorganischer und organischer Form zur Resorption gelangen. Anorganischer Schwefel wird bei Aufnahme per os oder durch die Haut von den im Organismus vorhandenen Thiolen in Sulfid verwandelt, das seinerseits sehr rasch zu Sulfat oxydiert wird. Bei Verabreichung von elementarem, radioaktivem S^{35} wurde auch ein Einbau in Eiweißkörper bzw. Cystin beobachtet. Das Sulfation wird wegen seiner schlechten Diffusionsfähigkeit von der Darmwand nur schlecht resorbiert. Im Blut liegt es zum Teil als freies Ion im Serumwasser vor, doch findet auch eine Bindung an Serumproteine und Aminosäuren statt (vgl. unten). Die Aufnahme von anorganischem Schwefel erfolgt in der Hauptsache in Form der S-haltigen Aminosäuren aus Nahrungseiweißstoffen. Nicht verwendeter, abgebauter oder oxydierter Schwefel wird zu 83% überwiegend im Harn, zu 17% durch Galle und Faeces ausgeschieden. Im Harn werden drei verschiedene Fraktionen unterschieden:

- a) Anorganisches Sulfat. Hierzu gehören neben direkt resorbiertem Sulfat alle schwefelhaltigen Stoffe, die vom Organismus bis zur 6-wertigen Stufe des Schwefels oxydiert wurden. Ihr Anteil an der Gesamturinausscheidung des Schwefels beträgt 88% (5). Die Fraktion ist meist vermindert bei schweren Vergiftungen, die umgekehrt einhergehen mit einer vermehrten Bildung von
- b) Schwefelsäure-Estern. Phenol, Kresol, Indoxyl, Skatoxyl und andere toxische Substanzen werden zur Entgiftung an anorganisches Sulfat gebunden. Das dazu nötige Sulfat liegt entweder primär im

Blut vor (6) oder wird durch Oxydation gewonnen (7). Die Ester-sulfat-Fraktion ist mit 7% an der Gesamtausscheidung beteiligt.

c) Neutralschwefel. Diese Fraktion enthält Spuren von Cystin und andere schwefelhaltige organische Verbindungen, die nicht vollständig oxydiert wurden. Es handelt sich also um "reduzierten" Schwefel. Der Anteil an der Gesamtausscheidung beträgt 5%.

Mit der Nahrung aufgenommener, hauptsächlich als Aminosäure resorbierter organischer Schwefel wird im Organismus zur Synthese von Körper- und Serum-Proteinen verwendet. Soweit Mangel an Cystin besteht, kann diese Aminosäure über Homocystein unter Anlagerung von Serin aus Methionin gebildet werden. Ein weiterer Teil wird, wie erwähnt, mehr oder weniger vollständig zu Sulfat oxydiert und erscheint in den einzelnen Fraktionen im Harn.

Über die Verwendung von anorganischem Sulfat im Organismus ist in den letzten Jahren eine große Reihe von Arbeiten erschienen. Die Autoren bedienten sich bei ihren Untersuchungen meist des künstlichen radioaktiven Isotops S^{35} . An erster Stelle sind Versuche an Ratten zu nennen, die D z i e w i a t k o w s k i durchführte (8). Er injizierte sieben Tage alten Ratten S^{35} -markiertes $NaSO_4$ intraperitoneal und fand eine hohe Aktivität im Knorpel der Tiere. Er zog daraus den Schluß, daß der Schwefel in die Chondroitinschwefelsäure (ein Glykoproteid) eingelagert werde. Es gelang ihm auch, markierte Chondroitinschwefelsäure aus dem Kniegelenkknorpel von Ratten zu isolieren (9). Darüberhinaus wies er die Einlagerung von $S^{35}O_4$ als Chondroitinsulfat in Bindegewebssubstanzen nach. B o s t r ö m (10) verfolgte die Aufnahme von radioaktivem Sulfat in der Chondroitinschwefelsäure des Knorpels von erwachsenen Ratten. Dabei war das Maximum der Aufnahme nach 24 Stunden erreicht. In einer anderen Arbeit berichtete er (11), daß sich der Einbau des Sulfats in die Chondroitinschwefelsäure nur unter maßgeblicher Beteiligung eines Fermentsystems unbekannter chemischer Natur vollziehe. Knorpelgewebsschnitte, die vor Einbringen in Tyrodelösung mit zugesetztem Radioschwefel gekocht oder bei 0° einer Stickstoffatmosphäre ausgesetzt worden waren, ließen einen Einbau vermissen. D z i e w i a t k o w s k i (12) sowie C u r r a n und G i b s o n (13) fanden bei Ratten und menschlichen Operations-

präparaten das Sulfation auch im Cytoplasma von Chondrocyten sowie in der nächsten Umgebung der Zellen lokalisiert. Weitere Versuche, die P e n n e y und B a l f o u r durchführten (14), erbrachten einen unmittelbaren Zusammenhang von Chondroitinschwefelsäure mit dem Aufbau kollagener Fibrillen. Bei der Ossifikation im Knochen reichert sich zuerst das Gewebe mit Mucopolysacchariden an. Erst dann kann es zur Bildung von Kollagen und Ablagerung des Hydroxylapatits kommen. Bei Versuchen über die Ablagerung von S^{35} in der Tibia von Ratten fanden K e n t und Mitarbeiter (15) im ganzen Knochen eine labile Sulfatform, die bei Entkalkung des Knochens entfernt wird, und eine beständige Form, die in hoher Konzentration in Gebieten aktiven Knochenwachstums anwesend ist und von Entkalkungsagentien nicht betroffen wird.

Diese Ergebnisse werfen gleichzeitig ein Licht auf die Bedeutung des Schwefels und der schwefelhaltigen Mucopolysaccharide für Wachstumsprozesse. D z i e w i a t k o w s k i (16) hatte im Tierversuch eine bevorzugte Speicherung von S^{35} in den Epiphysenfugen der Röhrenknochen nachgewiesen. L a y t o n (17) zeigte, daß Media und Intima des Aortenbogens bei ausgeschlüpften Kücken vom 10. Inkubationstag bis zu 6 Wochen nach dem Schlüpfen eine konstante Menge Sulfat benötigen. Er fand auch eine Fixierung von Sulfat im Granulationsgewebe heilender Wunden bei 30 bis 120 Tage alten Kücken (18). S c h r e i e r (19) studierte die Knorpelneubildung bei graviden Ratten und ihren Foeten. Er verwendete S^{35} -markiertes Methionin, dessen Schwefelgruppe zu einem beträchtlichen Prozentsatz in Chondroitinsulfate eingebaut wurde. Dabei übertraf die Einbaurate in die fetalen Knochenanlagen 5-10mal diejenige im Knorpelgewebe der Muttertiere.

Aber auch für die Bildung des Keim- und Granulationsgewebes auf heilenden Wunden erwies sich die Chondroitinschwefelsäure als nötig. U p t o n (20) fand eine relativ geringe Aufnahme von S^{35} -markiertem Sulfat in fünf bis zehn Tage alten Wunden von gesunden Meerschweinchen, dagegen relativ hohe Schwefel-Beträge bei Tieren mit experimentell erzeugtem Skorbut. Das aufgenommene Sulfat ließ sich dabei hauptsächlich extracellulär, am Ort der Fibrillenbildung lokalisieren. Vor der Produktion von retikulären Fasern wurden bei kranken und gesunden

Tieren geringe Mengen in den Fibroblasten gefunden. Dagegen zeigten unreife Fibroblasten keine Spuren von Sulfat-Einbau. K o d i c e k und L o e w i (21), ebenso später L o e w i und K e n t (22), wiesen in den Versuchen am Meerschweinchen nach, daß Granulationsgewebe die Fähigkeit hat, Sulfat zu fixieren. Diese Fähigkeit ist während der Bildung des Gewebes viel größer als nach seiner Ausreifung. Sie beobachteten beim skorbutkranken Meerschweinchen eine betont verminderte SO_4 -Speicherung durch das Granulationsgewebe, trotz der Anwesenheit normaler Mengen von Polysacchariden in der Wunde. Die Autoren schlossen daraus auf eine Interferenz der Krankheit mit dem Sulfonierungsprozeß und kamen in Übereinstimmung mit B o s t r ö m (10) zu dem Ergebnis, daß die Aufnahme des Sulfats durch das Granulationsgewebe an einen fermentativen Prozeß gebunden sei. Über die Möglichkeit eines Einbaues des Sulfations in Proteine und Aminosäuren liegen in der Literatur widersprüchliche Angaben vor. Nach B o s t r ö m (23) und Tarver (24) soll anorganisches, markiertes Sulfat nicht oder nur in sehr geringen Mengen in Cystin oder Methionin eingelagert worden sein, auch dann, wenn ein Mangel an jenen Aminosäuren bestand. Zur entgegengesetzten Ansicht gelangten C r e m e r und D i t t m a n n (25). Sie injizierten jungen Ratten anorganisches Sulfat und stellten Extrakte aus Knorpel, Knochen und Zähnen her, in welchen sie Proteine, Chondroitinschwefelsäure und Sulfat papier-elektrophoretisch voneinander trennten und mit chemischen bzw. färberischen Methoden zum Nachweis brachten. Dabei stellte sich heraus, daß S^{35} in Protein nicht nur nach Gaben von organischem Eiweiß und Aminoschwefelsäure, sondern auch nach Verabreichung von anorganischem Sulfatschwefel eingebaut wird, und zwar in einem die Angaben in der Literatur beträchtlich überschreitenden Ausmaß. Möglicherweise kann das junge Tier bei vorliegendem, gesteigertem Aminosäurebedarf leichter auf den Sulfatschwefel zurückgreifen, als dies bei erwachsenen Tieren der Fall ist. In diesem Zusammenhang sei noch kurz auf die schon erwähnte teilweise Bindung des Sulfations an Serumproteine eingegangen. D z i e w i a t k o w s k i (12) wies nach, daß in vivo beim Tier Sulfatschwefel an Serum-Proteine gebunden wird, hauptsächlich an Albumin, aber bis zu einem gewissen Grad auch an α - und β -Globuline. S m i t h und Mitar-

beiter (26) injizierten Ratten i.v. S^{35} -markiertes Na_2SO_4 und untersuchten nach 24 bzw. 48 Stunden die Radioaktivität sowohl des Gesamtserrums als auch der elektrophoretisch getrennten Einzelfractionen. Dabei fand man circa 40% der gesamten Serumaktivität mit einem Serumbestandteil kombiniert, der die elektrophoretische Beweglichkeit eines α_1 -Globulins hatte. Aller Wahrscheinlichkeit nach handelte es sich um die mit Schwefelsäure veresterte Kohlehydratgruppe eines Mucoproteins. Neuerdings war es wieder D z i e w i a t k o w s k i, der zeigte (27), daß eine kleine Fraction einer an Ratten als anorganisches Sulfat verabreichten Dosis von S^{35} als Cystin und Methionin aus den Serumproteinen der Tiere isoliert werden konnte. Der größte Teil des markierten Sulfats war dagegen an die Serumproteine selbst gebunden. Dieser Einbau betrug nach 6 Stunden circa 5-20%, nach 72 Stunden über 60 bis mehr als 90% des Totalserumgehaltes an S^{35} .

Zusammenfassend kann man sagen, daß resorbierter organischer Schwefel.- soweit er nicht oxydiert wird - hauptsächlich zur Synthese von Proteinen, anorganischer Sulfatschwefel zum Aufbau von Mucopolysacchariden herangezogen wird. Umgekehrt ist aber auch ein Einbau von schwefelhaltigen Aminosäuren in Glykoproteide und von Sulfat in Serumproteine beschrieben worden. Reduktion von Sulfat zur SH-Gruppe im Cystin kann nach den eindeutigen Befunden von C r e m e r und D i t t m a n n bzw. D z i e w i a t k o w s k i nicht von der Hand gewiesen werden; doch scheint diese Umwandlung nur in sehr geringem Maße stattzufinden.

Diese Ergebnisse zeigen den augenblicklichen Stand unserer Kenntnisse über die Zusammenhänge auf dem Gebiet des physiologischen Schwefelstoffwechsels an. Die Einführung markierter Substanzen hat auch hier Bahnbrechendes geleistet.

Ebenso lieferte die Anwendung der Isotopenmethode neue Aufschlüsse über den Schwefelumsatz im kranken Organismus. Bei experimentell (durch Verfütterung von Cholesterin an Kaninchen) erzeugter Arteriosklerose fand sich in den Intimaläsionen der Aorta ein hoher Mucopolysaccharidgehalt, dem ein verstärkter Einbau injizierten, S^{35} -markierten Sulfats entsprach (28). Da nach den schon erwähnten Ergebnissen Schwefel bevorzugt in das Granulationsgewebe von Regeneraten und Wunden eingebaut wird, stand a priori eine starke Beteiligung des Sulfat-

schwefels bei excessiven Wachstumsprozessen zu erwarten, besonders bei Tumoren, die mit einer starken Bindegewebsproliferation einhergehen, also bei Sarkomen und scirrhösen Malignomen. L a y t o n (29) wies 1949 mit Gewebekulturen, die in Tyrodelösung eingebracht und mit einem Zusatz von markiertem $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ versehen worden waren, nach, daß neben embryonalem Knorpel auch excidierte chondrogene Tumoren beim Menschen das Sulfation bevorzugt aufnehmen. In zwei Fällen von Chondrosarkomen gelang der Nachweis selektiver Sulfatspeicherung aus dem Operationspräparat. G o t t s c h a l k und A l l e n (41) injizierten $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ vor Amputation des befallenen Gliedes und wiesen die Schwefelanreicherung postoperativ nach. Bei Versuchen, die Aufschluß geben sollten über Gewebsverteilung und selektive Speicherung von Steroiden, injizierten L e w i s o n und Mitarbeiter (30) sieben Patienten, die an Brustkrebs erkrankt waren, neben Radionatrium-östronsulfat in einem Fall auch Radionatriumsulfat. Die Gabe des ersteren ergab im Mittel eine 14-fache Konzentrationszunahme des Sulfatschwefels im Krebsgewebe gegenüber der normalen Brust. Wurde $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ verabreicht, so steigerte sich der Mehrgehalt auf das 4,2fache. Bei all diesen Untersuchungen war der markierte Schwefel als parenteral verabreichtes Sulfat zur Resorption gelangt. Doch scheint auch zweiwertiger Schwefel eine selektive Anreicherung im Tumorgewebe zu erfahren. D o m a g a l l a und L e y (31) bestimmten die Gesamtschwefelausscheidung vor und nach oraler Verabreichung von inaktivem Cystin an 13 Gesunden und 21 Patienten mit gesichertem Leber-CA. Während vor Cystinbelastung die Gesamtschwefelausscheidung im 24-Stunden-Harn bei beiden Gruppen gleich war, stieg sie danach beim Gesunden um 81%, beim Malignomkranken hingegen nur um 31% an. Die Autoren werteten diese offensichtliche Schwefelretention im Sinne einer besonderen Cystin- oder Schwefelavidität des Tumorgewebes. Ob der hierbei wirksame Mechanismus des Schwefelstoffwechsels in gleicher Weise verläuft wie beim Einbau des Sulfations in Granulationsgewebe, ob und wie weit der Schwefelbedarf des tumorkranken Organismus auch zu Teilen aus dem SO_4 -pool gedeckt werden kann, oder ob hier eine Theorie von H e m m e t t eine Rolle spielt (32), wonach die Entwicklung zur bösartigen Wucherung der Zellen abhängig ist von der Konzentra-

tion der SH-Körper, sind Fragen, die bisher noch nicht geklärt werden konnten.

Von diesen pathophysiologischen Ansatzpunkten ausgehend, erschien es gerechtfertigt, radioaktiv markierten Schwefel zur Indikation maligner Prozesse heranzuziehen. Den entscheidenden Gesichtspunkt für die Wahl der Methodik bildete die Schwäche der von S^{35} emittierten Strahlung. Da die außerordentlich geringe mittlere Energie dieses Isotops ($E_m = 0,053 \text{ MeV}$) seinen Nachweis über der Körperoberfläche ausschließt, da andererseits aber auch Nachdruck auf eine möglichst frühzeitige Diagnose gelegt werden muß, kam methodisch nur der Versuch in Frage, eine eventuelle, selektive Speicherung des Schwefels aus einer Schwankung der Schwefelstoffwechselbilanz des tumorkranken Organismus (im Sinne eines Mehrverbrauchs) festzustellen. Für unsere Versuche wählten wir S^{35} -markiertes anorganisches, trägerfreies Sulfat. Entsprechende Untersuchungen mit Cystin werden von P e r l (33) durchgeführt.

II.

DIE VERSCHWINDERRATE VON ANORGANISCHEM, S³⁵-MARKIERTEM SULFAT

Methodik.

Grundlagen:

Injiziert man einem tierischen oder menschlichen Organismus eine bestimmte Menge radioaktiv markierten Sulfats und bestimmt anschließend den Abfall der Plasma- (bzw. Serum-) Aktivität aus Blutproben, die in gewissen Zeitintervallen abgenommen werden, so zeigt die durch die Meßpunkte gebildete Kurve einen exponentiellen Verlauf. Bei Wahl eines logarithmischen Maßstabes für die Ordinate stellt sich ein exponentieller Abfall als Gerade dar. Die Steigung dieser Geraden und damit die "Verschwinderrate" k der betreffenden Substanz aus dem Blut erhält man gemäß

$$k = \frac{\log \frac{I_1}{I_2}}{t}$$

(wobei I_1 und I_2 die Intensität der Strahlung an zwei aufeinanderfolgenden Zeitpunkten t_1 und t_2 in Impulsen/min. bedeutet. $t = t_2 - t_1$).

Nun besteht die Kurve des Abfalls der Plasmaaktivität aber, wie empirisch gefunden wurde, aus einer Überlagerung von mindestens zwei verschiedenen exponentiellen Anteilen. Demgemäß erhält man bei semi-logarithmischer Darstellung auch zwei Gerade von verschiedener Steigung. Ein derartiger Verlauf ist durch die Tatsache bedingt, daß unmittelbar nach der Injektion eine rasche, von hämodynamischen und osmotischen Kräften gelenkte Verteilung der Substanz auf das gesamte Plasmavolumen und darüber hinaus auf das damit im Ionenaustausch befindliche Volumen der übrigen extracellulären Flüssigkeitsräume erfolgt. Am Ende dieses Zeitabschnittes befinden sich die im Plasma anwesenden, injizierten Sulfationen mit den in extracellulären Nachbarräumen vorhandenen in einem stationären Diffusionsgleichgewicht.

Diesem relativ steilen initialen Abfall folgt ein langsames Absinken der Aktivität als Zeichen allmählichen, aktiven oder passiven Eindringens der Substanz in Körperzellen. Dieser Teil bleibt nahezu unverändert, zumindest über mehrere Stunden hinweg. An der Abnahme der Plasmaaktivität ist also, vom Stoffwechselgeschehen aus betrachtet, "passive" Diffusion ebenso beteiligt wie Ausscheidung der Substanz (in Urin und Faeces) und Einbau in körpereigene Stoffe, von denen aus keine Rückdiffusion mehr erfolgt. Diese Faktoren sind es, welche den unter physiologischen Bedingungen für eine Substanz typischen Kurvenverlauf der Plasmaverdünnung bestimmen. Es ist leicht einzusehen, daß Abweichungen der Ausscheidung einer Substanz von der Norm ebenso wie Veränderungen der Permeabilität der Gefäßwände und der Größe des extracellulären Flüssigkeitsraumes auch zu einer Veränderung des normalen Kurvenbildes führen müssen, weil dadurch entweder ein teils beschleunigter teils verzögerter Abtransport der Aktivität oder eine Verlängerung bzw. Verkürzung des steilen initialen Abschnittes eintritt. Die Bestimmung der Verschwinderrate schien daher aus theoretischen Erwägungen heraus geeignet, eine etwaige, durch Tumorstadium bedingte Schwefelavidität des Organismus zu erfassen. Da die Isotopenmethode eine hohe Empfindlichkeit verspricht, konnte ein Zeitraum von mehreren Stunden als ausreichend angesehen werden. Bei der Messung der Serumaktivität von i.v. injiziertem markiertem Methionin fand M a u r e r eine Kurve, die drei Abschnitte aufwies. Hier war, zwischen Initial- und Finalteil, eine dritte Strecke eingeschaltet, die zwischen den Abszissen 1/4 und 1/2 Stunde nach der Injektion verlief und vom Autor als Einbau in neugebildetes Eiweiß gedeutet wurde.

Diese, wenn auch noch lückenhaften Kenntnisse der Bedeutung der einzelnen Kurvenabschnitte wurden aus Versuchen zur Messung des extracellulären Flüssigkeitsvolumens gewonnen. Dabei hat die Verdünnungsmethode gute Dienste geleistet (35-39). Kennt man die Menge des injizierten Stoffes m' , die bis zum Zeitpunkt t ausgeschiedene Menge m'' und die dort beobachtete Konzentration c_i im interstitiellen Körperwasser, so läßt sich die Größe des von der Substanz bei t eingenommenen Flüssigkeitsraumes nach

$$V(d)_t = \frac{m' - m''}{c_i} \quad *)$$

*) $V(d)$ = Verteilungsvolumen, "volume of distribution".

berechnen. Um Aufschluß darüber zu erhalten, ob es sich bei dem zweiten, langsamen Abfall um ein weiteres Vordringen in extracelluläre Flüssigkeitsräume handelt oder um einen Vorgang des Schwefelstoffwechsels, bzw. das Eindringen in Körperzellen, bestimmte W a l s e r (37) V(d) an der Knickstelle der beiden Kurven, die bei 18 Minuten nach der Injektion lag. Das dabei erhaltene Volumen erwies sich mit 16% des Körpergewichtes in Übereinstimmung mit Bestimmungen von L e v i t t und G a u d i n o (35) als das des extracellulären Flüssigkeitsvolumens. Ein Kriterium für die Verwendbarkeit einer derartigen Substanz als Meßsubstanz für Körperflüssigkeitsräume bildet die Forderung nach möglichst geringer endogener Neubildung und geringfügigem Abbau während der Zeit der Messung. L e v i t t (35) hielt das Sulfation wegen vermuteter hoher endogener Bildung nicht für geeignet, wurde aber durch die guten Ergebnisse von Walser widerlegt. Über den weiteren Verbleib des Schwefels im Organismus äußerten W a l s e r (38) und R y a n (39) prinzipiell gleiche Vermutungen. Die Meinung des Ersteren, es könne sich in der zweiten Phase des Abfalls um ein Vordringen in schwer zugängliche Teile des extracellulären Flüssigkeitsraumes, ein sog. "transcelluläres Wasser" (= Wasser im Magen-Darm-Tractus, in Drüsenlumina, Urin, Harnleiter, Urethra) handeln, erwies sich als nicht zutreffend, da die in Frage kommenden Flüssigkeiten keine nennenswerten Aktivitäten aufwiesen. Andererseits überschreitet die Verschwinderrate des Sulfats aus dem Blut die Rate des SO_4 -Verlustes im Urin. Der Prozentsatz der verbleibenden Dosis, der in der Zeiteinheit aus dem Blut verschwindet, ist nach Walser doppelt so groß wieder im Urin erscheinende. Beide Autoren kamen daher übereinstimmend zu der Annahme, daß der Schwefel in der zweiten Phase des Aktivitätsabfalles verstärkt in Stoffwechselvorgänge einbezogen wird (Ryan nahm Aufbau von Taurocholin, Knorpelsubstanz und Muskelzellen oder Verwendung als gepaarte Schwefelsäure an).

Erwähnt sei in diesem Zusammenhang noch der Einfluß von pathologischen Volumenschwankungen auf die absolute Größe des extracellulären Raumes. R y a n (39) fand bei Patienten mit Ascites entsprechend höhere, bei Fällen von Exsikkose entsprechend verringerte Werte für das Gleichgewichtsvolumen V(d). Bei Untersuchungen an akut Fieberkranken

stellten C a r d a z o und Mitarbeiter (36) eine geringfügige, bei Ödemen verschiedener Ätiologie eine betonte Zunahme von V(d) fest.

Versuchsanordnung:

Es wurden Versuche an 13 Patienten vorgenommen. Bei sieben von ihnen war die Diagnose "maligner Tumor" vorher gestellt worden, bei den sechs anderen "Normalfällen" handelte es sich entweder um Gesunde oder um Patienten mit leichteren Krankheitsbildern, die teils zur Beobachtung, teils zur Durchführung physikalischer Therapie vorübergehend stationär aufgenommen werden mußten. Bei allen Normalfällen konnte das Vorliegen eines Neoplasmas ausgeschlossen werden. Die Versuchsdauer belief sich in allen Fällen auf circa 5 Stunden. Während dieser Zeit wurden in bestimmten Intervallen Blutproben aus einer Armvene entnommen (nach 3,6,10,20,40,60,100,200 und 300 Minuten . Die Häufung der Proben in den ersten 20 Minuten war erwünscht, um einen möglichst genauen Verlauf der Initialphase zu erhalten). In keinem der Fälle war eine Verabreichung von radioaktiven Substanzen für diagnostische oder therapeutische Zwecke vorausgegangen. Der Urin wurde 8,24,48,72 und 96 Stunden nach Injektion des Sulfats gesammelt. Katheter wurden dabei nicht verwendet.

Das radioaktiv markierte Schwefelpräparat bestand aus einer Lösung von trägerfreiem Sulfat. Die Darstellung des Schwefel-Isotops vollzieht sich im Atommeiler durch Neutronenbeschuß von Chlor gemäß $^{17}\text{Cl}^{35}(\text{n,p})^{16}\text{S}^{35}$. Der Schwefel zerfällt dann unter Emission einer schwachen β -Strahlung mit einer Halbwertszeit von 87,7d. Um zu vermeiden, daß dem Körper eine Strahlungsmenge zugeführt wird, die 0,3r im Laufe einer Woche übersteigt, wurden für Schwefel 250 μC als einmalige Höchstdosis für klinische, diagnostische oder therapeutische Zwecke angegeben (40). Wir verwendeten in einigen Fällen eine Dosis von 50 μC , mußten uns aber zur Ausschaltung von Fehlerquellen, die sich bei den einer so geringen Dosis entsprechenden, niederen Plasmaaktivitätswerten als sehr störend erwiesen, zu einer Dosis von 100-170 μC entschließen. Die so erhaltenen Impulszahlen lagen bei 1000-3000/min. Die zu applizierende Aktivitätsmenge wurde steril aufbereitet und war in 2ml einer sterilen physiologischen NaCl-Lösung ent-

halten. Um eine gleichmäßige Verteilung der äußerst geringen Sulfat-Menge im Blut zu erreichen, wurde ihr 1 ml einer 0,4%igen, mit NaCl auf Isotonie gebrachten Lösung von inaktivem Na_2SO_4 zugesetzt. Damit fand in jedem Fall durch Zufuhr von 4mg Na_2SO_4 (bei einem Durchschnittsgehalt des Gesamtblutvolumens an freiem anorganischem Sulfat von circa 17-40mg) eine Angleichung an die im Körper herrschenden physiologischen Verhältnisse statt. Zur Bestimmung des S^{35} -Gehaltes im Urin (in Prozent der injizierten Gesamtdosis) wurden aliquotäre Proben gesondert aufbereitet.

Um den Patienten mehrmaliges Punktieren zu ersparen, wurde eine Dauerkanüle gelegt, aus der über einen verschließbaren Ansatzhahn Blutproben - jeweils 5 ml - zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen werden konnten. Zur Verhinderung einer Verstopfung der Kanüle mit Blutkoagula wurde sie nach jeder Entnahme vorsichtig mit etwas Natriumcitrat gefüllt. Der Radioschwefel wurde getrennt jeweils am anderen Arm injiziert, um Fehler infolge einer Verunreinigung der Blutproben durch haftende Teile des unverdünnten Präparates auszuschalten. Nach Ablauf von 1 1/2 Stunden wurde die Kanüle entfernt. Die Erfahrung zeigte, daß die Patienten während dieser Zeit, in der sie den Arm mit der Kanüle möglichst bewegungslos in ausgestreckter Lage ließen, über keine nennenswerten Beschwerden klagten. Bei Überschreiten dieses Zeitraumes jedoch stellten sich entzündliche Reizerscheinungen an dem betreffenden Arm ein, die meist eine sofortige Entfernung der Kanüle notwendig machten. 1 1/2 Stunden erwiesen sich auch als Zeitmaximum für die freie Durchgängigkeit der Kanüle. In einigen Fällen mußte die Kanüle wegen vorzeitigen Verschlusses herausgenommen und weitere Blutproben durch neuerliches Punktieren gewonnen werden.

Den Blutproben wurde ein gerinnungshemmender Stoff zugesetzt. Anschließend wurde durch Zentrifugieren Plasma von den Blutkörperchen abgetrennt und nach einem der unten beschriebenen Verfahren weiter verarbeitet.

Nachweis des Schwefels:

Infolge der außerordentlich schwachen Strahlung des Radioschwefels bereitet sein Nachweis gewisse Schwierigkeiten. Zur Messung eignen

sich nur Glimmerfenster- β -Zählrohre oder noch besser, weil empfindlicher, Methandurchflußzählgeräte mit einer 2π -Geometrie. Hier wird das Präparat direkt in die Zählkammer eingebracht, ohne daß Absorption durch das Zählrohrfenster die Strahlung vorher abschwächen kann. Auch ist der Geometriefaktor hier bedeutend günstiger, da der wirk-same Raumwinkel erheblich vergrößert wird. Ein mehratomiges Gas zer-setzt sich bei jedem Ionisationsprozeß, sodaß ein geschlossenes Zähl-rohr mit der Zeit unbrauchbar wird. Kontinuierlicher Durchfluß eines Zähl-gases vermeidet diesen Nachteil. Allerdings erstreckt sich die hohe Empfindlichkeit dieses Meßgerätes (FH 51, Firma Frieseke&Höpfner, Erlangen) auch auf Beeinträchtigungen der geforderten geometrischen Verhältnisse, sei es infolge unzureichender homogener Aufbereitung der Präparate oder räumlicher Schwankungen der Oberflächenspannung. Auf die Beseitigung gerade dieser Fehlerquelle mußte daher besonderes Augenmerk gerichtet werden.

Bei unseren Versuchen wurde der Nachweis des Schwefels nach meh-reren, im Folgenden einzeln genauer beschriebenen Methoden geführt. Mit Ausnahme einer einzigen erwiesen sie sich - wenn auch teilweise mit mehr oder weniger großen Mängeln behaftet - prinzipiell als ge-eignet zur Wiedergabe des Abfalls der Plasmaaktivität. Doch war es zur Ausschaltung möglicher Fehlerquellen, ebenso wie um wiederholte Fehlschläge der zum Teil sehr langwierigen Aufbereitungsprozesse zu vermeiden, nötig, die sicherste und Fehlerquellen gegenüber am wenig-sten anfällige Methode zu wählen.

1) Nachweis direkt aus dem Blut (bzw. Harn). Es ist gleichgültig, ob Plasma, Serum oder Vollblut verwendet werden. Da die Blutkörper-chen keine wesentlichen Mengen der injizierten Dosis speichern, führ-ten wir alle Versuche mit Plasma durch. Dem Vorteil einer einfachen und mühelos durchführbaren Technik steht als Nachteil eine geringe Ausbeute an Impulsen gegenüber, da die strahlende Oberfläche von 1-2ml Plasma nur sehr wenig Aktivität enthält. Von den unten beschrie-benen Möglichkeiten ließ sich nur die zweite brauchbar realisieren.

a) Aufbereitung von Plasma-(Serum-)Trockenpräparaten im Aluminium-präparataschälchen: In das sauber gereinigte Schälchen gibt man eine bestimmte, abgewogene Menge eines radioaktives SO_4 enthaltenden

Serums (bzw. Plasma oder Harn) und läßt das Präparat entweder an der Luft oder im Trockenschrank bei circa 45° eine Nacht lang trocknen. Um ein Splittern und Ablösen des Serums zu vermeiden, wurde es vorher mit einer geringen Menge von Harnstoff (ca. 50mg/ml) versetzt. Versuche, mit dieser Methode gesetzmäßige Veränderungen der Schwefelaktivität wiederzugeben, verliefen negativ. Es gelang nicht, eine Selbstabsorptionskurve aufzustellen. Die erhaltenen Werte wiesen keinerlei verwertbaren Zusammenhang auf. Da die Messung der gleichen Präparate mit einem unempfindlichen β -Glimmerfenster-Zählrohr (FHZ 15) etwas bessere Ergebnisse brachte (die Impulszahlen lagen wesentlich unter den mit dem empfindlicheren Gerät gemessenen), darf man den Schluß ziehen, daß verschiedenartige Kapillarascensionen an den Rändern des Flüssigkeitsspiegels bzw. Inhomogenitäten der Oberflächenspannung zu einer von empfindlichen Apparaten registrierten Störung der geometrischen Strahlungsverhältnisse führten.

b) Plasma-(bzw.Serum-)Trockenpräparate, aufgetragen auf runde Glasplättchen (nach einer Anregung von D i r n a g l): Letztere besaßen einen Durchmesser, der um etwa 2mm kleiner als der des Schälchens war. Das Glasplättchen bildete so eine kreisrunde Insel im Präparateschälchen, von dessen Rändern es durch eine ringförmig geschlossene Vertiefung getrennt war. Wurde Plasma mit der Pipette aufgetragen, so bildete sich ein gleichmäßiger, nach oben gewölbter Meniskus; bei vorsichtiger Handhabung kam es fast niemals zu einem Überlaufen der verhältnismäßig viskösen Flüssigkeit. Auch hier war durch Zusatz von Harnstoff ein Splittern des Plasmas verhindert worden. Die Glasplättchen waren in den Schälchen mit Klebstoff befestigt. Nach Aufbringen des Plasmas wurden die nassen Präparateschälchen möglichst erschütterungsfrei in einen Trockenschrank oder unter den Abzug gestellt. Auf diese Weise gelang es, die unter a) erwähnten, durch unterschiedliche Oberflächenspannung bedingten Strahlungsinhomogenitäten auszuschalten.

Eines der Hauptprobleme beim Nachweis des Schwefels ist der Verlust an Strahlung infolge von Absorption durch das strahlende Präparat selbst. Zur Korrektur dieser Selbstabsorption beim Vergleich von Präparaten verschiedener Aktivität und verschieden großer Schichtdicke (mg/cm^2) ist daher die Aufstellung einer Eichkurve erforderlich. Von

den hierfür möglichen Methoden wählten wir die der Bestimmung der maximal beobachtbaren Aktivität in "unendlichen Schichtdicken". Hierbei werden Plasmapräparate mit verschiedenen Schichtdicken von $1\text{mg}/\text{cm}^2$ bis zu $30\text{mg}/\text{cm}^2$ hergestellt. Die Inkremente werden einer mit etwas aktivem Sulfat versetzten Plasmamenge entnommen; sie besitzen gleiche spezifische Aktivitäten. Während im ersten Teil der erhaltenen Kurve (vgl. Anhang) Proportionalität zwischen der Menge der eingewogenen Substanz und der gemessenen Aktivität besteht, macht sich die zunehmende Absorption zunächst durch einen sanfter ansteigenden exponentiellen Abschnitt bemerkbar, der von einer bestimmten "Grenzschichtdicke" an in einen konstanten Wert übergeht. Bei Präparaten, die eine jenseits der Grenzschicht liegende Schichtdicke aufweisen, sind die Aktivitäten daher unabhängig von der Einwaage und verhalten sich wie die absoluten spezifischen Aktivitäten der zu untersuchenden Präparate.

Die Glasplättchenmethode lieferte eine Selbstabsorptionskurve, deren Verlauf - sieht man von einem geringfügigen, schwer erklärbaren Abfall der Aktivität im konstanten Teil ab - dem in der Literatur beschriebenen entsprach (Grenzschichtdicke bei ca. $9\text{mg}/\text{cm}^2$). Die verwendeten Präparate hatten bei einer Einwaage von 800mg Plasma und 40mg Harnstoff alle die unendliche Schichtdicke erreicht. Andererseits war diese Menge das Optimum dessen, was auf einem Glasplättchen Platz findet. Um die Brauchbarkeit der Methode für die Bestimmung der Verdünnungskurve zu prüfen, wurden vorbereitende Versuche an sechs erwachsenen und einem jungen Kaninchen angestellt. Jedem der Tiere wurden $100\mu\text{C}$ radioaktives Sulfat in die Ohrvene injiziert. Anschließend wurden während eines Zeitraumes von 5 Stunden acht Blutproben (jeweils 2ml), ebenfalls durch Punktion der Ohrvene, entnommen. Einwaage und Aufnahme der Serumpräparate erfolgten in der erwähnten Weise. Neben gesunden Tieren wurde auch ein junges Tumorkaninchen auf diese Weise untersucht. Es handelte sich um einen Fall von Brown-Pearce-Tumor, welcher durch Injektion einer Suspension von Netzmastasen einer derartigen Geschwulst in beide Hoden erzeugt worden war (1). Die gemessenen Serumaktivitätswerte lagen mit hinreichender Genauigkeit auf Kurven, die den Abfall der Aktivität im Serum gut wiedergaben. Anders lagen die Verhältnisse, wenn die Untersuchungen an Patienten angestellt

wurden. Das um ein Vielfaches größere Gesamtblutvolumen (bzw. Volumen der extracellulären Flüssigkeit) beim Menschen und der dadurch bedingte höhere Verdünnungsgrad der injizierten Dosis konnten durch eine Erhöhung dieser Dosis nur sehr unvollständig kompensiert werden. Andererseits liefert nach Erreichen der Grenzschichtdicke eine Erhöhung der Gewichtsmenge/cm² - etwa durch mehrmaliges Auftragen von Serum auf bereits getrocknete Schichten - keine Erhöhung der Impulszahl mehr. Aus alledem ergab sich für menschliches Plasma eine Abnahme der Impulszahl um circa eine ganze Zehnerpotenz. Zwar erhielten wir auch hier verwertbare Kurven, doch zeigten die Punkte einen höheren Grad von Streuung als bei den Tierversuchen. Es hat den Anschein, daß Fehlerquellen, die bei der besonderen Art dieser Aufbereitung in Erscheinung treten, erst nach Unterschreiten einer bestimmten Impulszahl pro Minute störend ins Gewicht fallen. Zu solchen Fehlerquellen gehört in der Hauptsache die Unmöglichkeit, eine gleichmäßige Geometrie der strahlenden Oberflächenschicht zu erreichen. Dies ist einmal zu erklären durch die Bildung eines eigentümlichen "Koagulationspropfens" auf der Oberfläche des trockenen Präparates, der in den meisten Fällen beobachtet wurde und möglicherweise zu einer Störung der Absorptions- und Strahlungsverhältnisse beiträgt. Zum andern mag die nicht immer vermeidbare Brüchigkeit des getrockneten Serumpräparates eine Rolle spielen. Auch der Umstand, daß die Vorschrift, das Präparat müsse zumindest halbleitend mit dem Präparateschälchen verbunden sein, hier nicht eingehalten werden konnte, ist als Störungsursache in Betracht zu ziehen. Die Anwendung dieser Methode empfiehlt sich also eigentlich nur bei Präparaten, die eine Aktivität von circa 10 000 Impulsen pro Minute aufweisen.

c) Aufbereitung auf Filterpapier (Josefspapier, Schleicher&Schüll, Hahнемühle, Dassel, Nr.2478): Um eine noch größere Homogenität der strahlenden Oberfläche zu erzielen, wurden dünne Filterpapierblättchen mit Plasma getränkt. Da beim Arbeiten mit Schichtdicken, die über der Grenzschicht liegen, eine größere Menge Plasma erforderlich ist, wurden mehrere (bis zu 10) Filterpapierstücke übereinander gelegt, die insgesamt bis zu 500mg Plasma aufnehmen konnten. Auch hier erhielten wir bei der Aufstellung einer Selbstabsorptionskurve nach dem unter b) be-

schriebenen Verfahren gute Ergebnisse. Es wurde wieder eine Reihe von Präparaten angefertigt, wobei zu einer Ausgangsmenge von wenigen mg Serum, mit dem ein Filterpapierstückchen durchtränkt war, Inkremente von jeweils einem Filterpapier und einer Plasmanazmenge von 45 mg zugegeben wurden. Der Verlauf der Kurve entsprach ziemlich genau dem unter b) erhaltenen. Die einzelnen Filterpapierstückchen waren übereinander gelegt, ohne besonders im Schälchen befestigt zu werden. Sie wurden ausgestanzt und hatten einen Durchmesser, der etwas größer war als der des Schälchens, sodaß sie sich dessen Rändern anlegten. Das Durchtränken des Papiers mit dem Plasma erforderte große technische Geschicklichkeit, da ein möglichst gutes Aneinanderhaften der einzelnen Filterpapierblättchen erreicht werden mußte. Die völlige Entfernung der Luftbläschen aus den Zwischenräumen und die Vermeidung störenden Sichaufwerfens des getrockneten Papiers gelang nur in wenigen Fällen, was sicher eine nicht unbeträchtliche Fehlerquelle darstellte. 8 bis 10 Blättchen besaßen genügend Saugkraft, um 500mg Plasma zu binden; die Kapillarität an den Rändern des Schälchens führte leicht zu Verunreinigungen. Obwohl wir in einem Fall eine verwertbare Kurve erhielten für den Abfall der Plasmaaktivität, weist die große Streubreite einiger Meßpunkte auf ihre Ungenauigkeit hin. Wir kamen daher sehr rasch wieder von der Anwendung dieser Methode ab. Doch dürfte sie für kleine Plasmamengen mit relativ hoher Aktivität gut geeignet sein.

2) Fällung des Schwefels als schwerlösliches Sulfat nach vorausgegangener Veraschung. Hierdurch lassen sich im Präparat höhere Aktivitäten anreichern; die spezifische Aktivität der strahlenden Oberfläche wird wesentlich vergrößert. Die mit dieser Methode erhaltenen Ergebnisse wiesen eine höhere Genauigkeit auf als die unter 1) gewonnenen; freilich erforderte der Nachweis des Schwefels hier die Durchführung eines sehr zeitraubenden und komplizierten Arbeitsprozesses. Wichtig ist zunächst die völlige Oxydation des gesamten, in Blut und Harn vorhandenen, anorganischen und organischen Schwefels zu Sulfat. Von den möglichen Verfahren erwies sich die Methode der nassen Veraschung (42) als die sicherste.

Jede Blutprobe wurde zentrifugiert und 2ml Plasma in einen 100ml-Kjeldahl-Kolben pipettiert (Harnproben wurden ebenso behandelt). Die

Proben wurden dann mit 15ml 65%iger HNO_3 versetzt, im Sandbad erhitzt und auf einige ml eingeeengt. Hierauf wurde erneut mit wenigen ml HNO_3 aufgenommen und wieder eingeeengt etc. HNO_3 wurde so lange zugesetzt, bis keine Reduktion der Säure zu Stickstoffoxyd mehr eintrat, was am Ausbleiben der braunen Dämpfe im Kolben zu erkennen war. Was jetzt noch an oxydablen Bestandteilen im Kolben zurückblieb, wurde auf ähnliche Weise durch wiederholte, vorsichtige Zugabe einiger ml 38%iger HClO_4 oxydiert. Nach abgeschlossener Oxydation zeigte die Flüssigkeit im Siedezustand eine grünliche Färbung, die beim Abkühlen verschwand. Das Auftreten weißer (von unverbrauchter HClO_4 herrührender) Dämpfe ist ebenfalls ein sicheres Anzeichen dafür, daß keine weitere Oxydation mehr erfolgt. Die Durchführung dieses Prozesses nimmt ganze zwei Tage in Anspruch. Alle Versuche, einen rascheren Ablauf der Oxydationsvorgänge durch stärkeres Erhitzen, vermehrte Säurezugabe etc. herbeizuführen, verliefen entweder negativ oder führten zu Ergebnissen, die mit großen Fehlern behaftet und daher nicht zu verwerten waren. Reste nicht oxydierten Materials verursachten dabei erhebliche Störungen beim Ausfällen des Sulfats als schwerlösliches Benzidin- oder Bariumsalz.

Nach dem Erkalten wurden die Lösungen mit destilliertem Wasser vorsichtig verdünnt und in 100ml-Bechergläser gegossen. Die Kolben wurden mehrere Male sorgfältig mit destilliertem Wasser nachgespült. Da die Fällung des Sulfats im schwach sauren Milieu zu erfolgen hatte, mußten die stark sauren Lösungen zunächst mit 50%iger Natronlauge neutralisiert werden. Titriert wurde mit Phenolphthalein als Indikator bis zur Rotfärbung der Lösungen. Zum Ansäuern wurde $\frac{n}{1}$ HCl verwendet. Meist genügten jedoch die 3-4ml der als Trägersubstanz zugesetzten $\frac{n}{10}$ H_2SO_4 . Da es sich bei dem in 2ml Serum enthaltenen Schwefel um eine Gewichtsmenge von circa 60 γ handelt, wäre eine verlustlose Aufbereitung der Niederschlagsmenge nicht durchführbar gewesen. Aus diesem Grund erwies es sich als nötig, eine inaktive "Trägersubstanz" zuzugeben ($\frac{n}{10}$ H_2SO_4), in der eine gleichmäßige Verteilung der aktiven Moleküle angenommen wurde. Um ungefähr gleiche Schichtdicken der fertigen Präparate zu erzielen, wurde so viel Trägersubstanz zugesetzt, wie nötig war, um bei Fällung als Benzidinsulfat eine Niederschlagsschichtdicke von 15mg/cm²,

bei Fällung als Bariumsulfat eine solche von $30\text{mg}/\text{cm}^2$ zu erhalten.

Auch bei dieser Methode ist das Problem der Selbstabsorption von größter Bedeutung. Wie schon erwähnt, können Präparate nur verglichen werden, wenn sie gleiche Dicken des absorbierenden Materials aufweisen. Um Korrekturen für abweichende Schichtdicken angeben zu können, wurden oben genannte Werte als Bezugsschichtdicken festgelegt und eine Eichkurve nach folgendem Verfahren bestimmt (43): In eine Reihe von Bechergläsern wurden ansteigende Mengen einer $\frac{n}{10} \text{H}_2\text{SO}_4$ -Lösung gegeben. Jedem Glas wurde sodann die gleiche bestimmte Menge radioaktiven Sulfats zugesetzt. Fällung des Sulfats mit BaCl_2 oder Benzidinhydrochlorid und Aufbereitung der Niederschläge ergab eine Folge von Präparaten mit verschiedener Schichtdicke bei gleicher enthaltener Aktivität. Die Messung der Präparate lieferte eine Kurve, deren Verlauf nach Ågren durch die Beziehung

$$I = \int R dr$$

festgelegt ist (vgl. Anhang). Indem der Kurvenpunkt für die Abszissen 15 bzw. 30 mg gleich 1 gesetzt wurde, ließ sich aus der Kurve für jede Schichtdicke ein Selbstabsorptionsfaktor f bestimmen. Der bezüglich der Eigenabsorption korrigierte Meßwert ergab sich dann zu

$$I = \frac{I_m - I_0}{f}$$

wobei I_m die Zahl der gemessenen Impulse pro Minute, I_0 den Nullwert und f den Selbstabsorptionsfaktor bedeuten.

Der Kurvenverlauf zeigte sich unabhängig davon, ob das Sulfat mit BaCl_2 oder Benzidinhydrochlorid gefällt wurde. Doch fanden wir, daß in der Verwertbarkeit dieser beiden Fällungsmethoden Unterschiede bestanden.

a) Fällung als Benzidin-Sulfat: E. Ågren berichtete in einer Arbeit über Sulfatfällung mit Benzidinhydrochlorid (43) über vergebliche Versuche, reproduzierbare Präparate zu erhalten, die durch Fällung des Sulfats als BaSO_4 gewonnen worden waren. Er schreibt die Überlegenheit der Benzidin- über die Bariummethode dem Umstand zu, daß der Benzidinniederschlag einheitlichere Niederschläge liefert. Wir entschlossen uns daher - obwohl in der Literatur vielfach von der Benzidin-fällung nach vorausgegangener Veraschung wegen Anwesenheit anderer, die Fällung beeinflussender Ionen abgeraten wird - das Sulfat

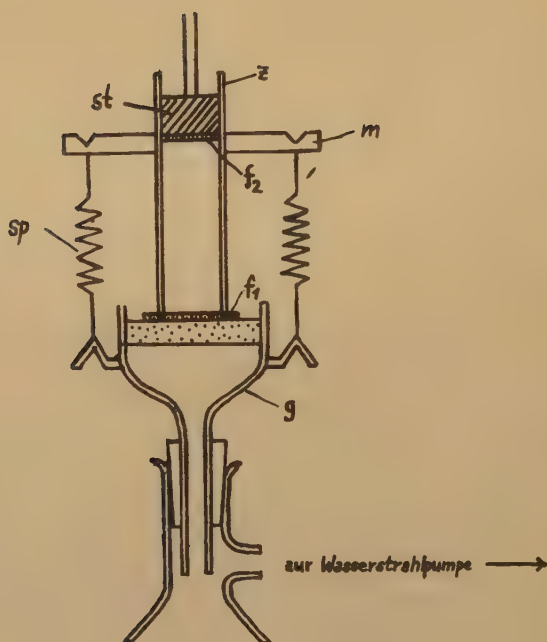
zunächst als Benzidinsalz niederzuschlagen. Dazu wurden die neutralisierten und mit Trägersubstanz versehenen Lösungen auf einen p_H -Wert von 6-7 eingestellt (Universal Indikatorpapier), bis zum Sieden erhitzt und auf ein Volumen von 20-30ml eingeeengt. Dann wurden 20 ml einer gesättigten Lösung von Benzidinhydrochlorid, ebenfalls in der Siedehitze, zu jeder Probe gegeben. Nach dem Erkalten fiel der Niederschlag zögernd in Form feinsten, seidig schimmernder Nadeln aus. Nach 12stündigem Stehenlassen erfolgte die Aufbereitung auf das Präparatenschälchen. Längeres Stehenlassen erwies sich als ungünstig, weil dadurch die Größe der Niederschlagspartikel zunahm. Was die Brauchbarkeit dieser Methode betrifft, so konnten zunächst die guten Ergebnisse von Ägren bei der Aufstellung der Absorptionskurve bestätigt und reproduziert werden. Sie sind nicht zuletzt darauf zurückzuführen, daß lediglich das freie Sulfation ohne Zusatz anderer Ionen vorlag. Bei der Fällung von vorher veraschten Lösungen waren die Ergebnisse dagegen unterschiedlich. Wir erhielten einige gute, in ihrem Verlauf eindeutig festgelegte Kurven, in anderen Fällen dagegen Meßpunkte, die keinen kurvenähnlichen Verlauf zeigten. Da hier auch die Niederschlagsgewichte teilweise beträchtlich voneinander abwichen, lag der Gedanke nahe, daß neben Benzidinsulfat auch teilweise schwerlösliches Nitrat bzw. Chlorid mit ausfiel. Unsere Versuchsergebnisse zeigten, daß diese Störung auf unkontrollierbare Weise bei einem Versuch auftrat, um beim nächsten auszubleiben. Die Unzuverlässigkeit dieser Methode läßt daher auf die Dauer die Fällung mit $BaCl_2$ als empfehlenswerter erscheinen, selbst wenn man bei ersterer vielleicht homogenere Niederschläge zu erhalten vermag.

b) Fällung als Bariumsulfat. Die neutralisierten Lösungen werden mit 1ml $\frac{N}{1}$ HCl angesäuert, nach Zusatz einer im Hinblick auf die gewünschte Niederschlagsmenge berechneten Menge von Trägersulfat zum Sieden erhitzt und auf ein Volumen von ca. 20ml eingeeengt. Desgleichen erhitzt man eine 1%ige $BaCl_2$ -Lösung. Die Fällung erfolgt in der Hitze durch tropfenweise Zugabe von 5-6ml der letzteren, wobei sich der Niederschlag ohne jeden Verzug schlagartig bildet. Auch hier nahm die völlige Ausbildung des Niederschlags einen Zeitraum von 12 Stunden in Anspruch. Erst im Anschluß daran konnte mit der beiden Methoden gemein-

samen Aufbereitung im Präparateschälchen begonnen werden.

Von allen angeführten Methoden hat sich die Fällung als Bariumsulfat am besten bewährt. Im Vergleich zur Benzidinmethode zeichnet sie sich durch hohe Unempfindlichkeit gegenüber der Anwesenheit anderer, eventuell störender Ionen aus. Es ließen sich keinerlei Unterschiede feststellen zwischen Präparaten, die aus unveraschten Lösungen (Absorptionskurve) und solchen, die aus veraschten Lösungen (Serum) niedergeschlagen worden waren, weder im Hinblick auf die Gesetzmäßigkeit der Kurvenpunkte noch auf die Gewichte der erhaltenen Niederschläge, die nur um wenige mg untereinander differierten. Da die Fällung sehr leicht durchzuführen und weitgehend unabhängig von genauen Einstellungen des P_H -Wertes ist, da außerdem Bariumsulfat hinsichtlich der endgültigen Aufbereitung des Niederschlages auf das Präparateschälchen noch einen großen, unten näher zu besprechenden Vorteil gegenüber Benzidinsulfat bietet, darf man diese Methode wohl als die genaueste und sicherste von allen hier beschriebenen bezeichnen. Auf das Problem der Reproduzierbarkeit, welches Agren als Einwand gegen eine Fällung mit Bariumchlorid ansieht, näher einzugehen, war uns im begrenzten Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Wir möchten jedoch noch einmal darauf hinweisen, daß die mit dieser Methode gewonnene Absorptionskurve in dem beobachteten Bereich fast völlige Übereinstimmung mit der mittels Benzidinsulfats gewonnenen zeigte und auch an Genauigkeit der Kurvenpunkte nicht hinter jener zurückstand (vgl. Anhang).

Beim Aufbringen des Niederschlages auf das Schälchen müssen alle schon erwähnten Forderungen berücksichtigt werden, die ein fertiges, zum Messen bereites Präparat erfüllen soll. Vor allen Dingen ist für eine möglichst homogene Beschaffenheit der strahlenden Oberfläche zu sorgen. Wesentlich für die Wahrung der strahlungsgeometrischen Verhältnisse ist auch eine gleichmäßige Schichtdicke. Da wir zur Korrektur der gemessenen Impulsrate bezüglich der Selbstabsorption alle Niederschlagsmengen auf eine einheitlich festgelegte Schichtdicke bezogen, war eine genaue Bestimmung der Niederschlagsgewichte von besonderer Bedeutung. Dazu wurden die Schälchen zweimal gewogen, einmal ohne Niederschlag zusammen mit dem Filterpapier und einer Klebfolie (zum Fixieren des Filterpapiers im Schälchen), das andere Mal mit getrocknetem



Niederschlag. Die Differenz dieser Werte, dividiert durch die Fläche, welche das Präparat im Schälchen einnimmt, lieferte dann die Schichtdicke in mg/cm^2 . Zum Aufbringen des Niederschlages auf das Filterpapier fand eine von Ågren beschriebene Apparatur Verwendung (vgl. Abb.). Sie ermöglicht es, den Niederschlag als eine dünne Scheibe mit glatter Oberfläche auf eine kreisrunde Fläche aufzupressen. Zu diesem Zwecke wurde, nach einer von Ågren vorgeschlagenen Anordnung, ein rundes Filterpapierblättchen (f_1) vom Durchmesser des Präparateschälchens ausgestanzt und auf eine Glasnutsche (g) von bekannter Porosität gelegt, die durch einen durchbohrten Gummistopfen in eine gewöhnliche, mit einer Wasserstrahlpumpe verbundene Saugflasche reichte. Die Befestigung

des Filterpapiers auf der Glasnutsche erfolgte durch den Druck eines eng aufsitzenden, offenen und kalibrierten Glaszylinders (z) (Teil einer 10ml-Ultraseptspritze), dessen Durchmesser mit 15,7mm unter dem des Filterpapiers lag. Der Glaszylinder war von einem schmalen, verstellbaren Metallring eingefaßt (m), der zwei einander gegenüber liegende Spiralfedern (Sp) trug, mit denen der Zylinder fest gegen die Glasnutsche gedrückt wurde. Zur Befestigung der Federn an der Nutsche diente ebenfalls ein starker Drahring (d).

Die den Niederschlag enthaltende Lösung wurde vorsichtig in den Glaszylinder gegossen; unter Anwendung eines starken Soges wurde der Niederschlag auf der durch den kreisförmigen Querschnitt des Zylinders begrenzten Fläche des Filterpapierstückchens konzentriert. Um ein Haften von Niederschlagspartikeln an den Zylinderwänden zu vermeiden, wurde sorgfältig mit destilliertem Wasser und 70%igem Alkohol nachgespült. Während der feine, mehlartige Bariumsulfat-Niederschlag auf diese Weise ohne jede zusätzliche Behandlung Präparate von homogener Oberfläche lieferte, mußte bei dem schwammigen Benzidinsulfat-Niederschlag ein Kunstgriff angewandt werden, um zu brauchbaren Oberflächenverhältnissen zu gelangen. Es wurde ein Ultraseptspritzenstempel (st) vom gleichen Durchmesser wie der Zylinder so zugeschliffen, daß der konische Stempel mit einer ebenen Fläche abschloß. Dann wurde ein Filterpapierblättchen (f_2), ebenfalls vom gleichen Durchmesser, ausgestanzt, in Wasser getaucht und in nassem Zustand auf den Stempel aufgedrückt. Führte man nun nach Absetzen des Niederschlages den Stempel in den Zylinder ein, so wurden dadurch nicht nur die letzten Reste mechanisch von den Wänden entfernt, sondern der Niederschlag selbst zwischen zwei Filterpapieren eingepreßt. Daraufhin wurden durch Hochschieben erst der Zylinder vom ersten Filterpapier, dann der Stempel vom zweiten Blättchen vorsichtig gelöst. Letzteres haftete jetzt fest am Präparat und konnte nach Auftropfen von Alkohol (70%) und Äther und anschließend, etwa fünfminütigem Trocknen unter einer Infrarotlampe abgenommen werden. (nachdem die Wasserstrahlpumpe vor dem Trocknen abgedreht worden war). Dieses Verfahren lieferte zwar sehr einheitliche Benzidinsulfatpräparate, besaß aber den Nachteil der Einführung einer

neuen Fehlerquelle. Denn es ließ sich selbst bei sehr vorsichtigem Arbeiten nicht immer vermeiden, daß beim Abheben des Deckblättchens wechselnde Mengen des Niederschlages haften blieben. Welchen Einfluß dieser Fehler auf die Höhe der gemessenen Impulse hat, vermochten wir nicht zu überblicken, doch ist es sehr wohl möglich, daß er Anteil hat an den teilweise schlechten Ergebnissen mit Benzidinsulfat.

Alle durch Aufbereitung nach den besprochenen Methoden gewonnenen Präparate wurden getrocknet und im Methandurchflußzähler gemessen. Da der bei radioaktiven Messungen auftretende Fehler eine Funktion der Zahl der gemessenen Impulse ist, wurde darauf geachtet, die Meßzeit so lange auszudehnen, daß insgesamt etwa 10 000 Impulse zur Messung gelangten. Nach

$$m = \pm \sqrt{n}$$

beträgt der Fehler dann nur 1%.

Fehlerquellen:

Neben den im vorigen Kapitel bereits besprochenen muß noch eine Reihe von Fehlerquellen erwähnt werden, die entweder ganz allgemein beim Arbeiten mit radioaktivem Schwefel auftreten oder mit der besonderen Anordnung der Versuche in Zusammenhang stehen. Was die Beurteilung ihres Einflusses bzw. ihrer Vermeidbarkeit so sehr erschwert, ist die Tatsache, daß die lange Dauer der Versuche, die Schwierigkeit ihrer Durchführung, die große Anzahl der Teilprozesse und der bei diesen Prozessen Verwendung findenden Geräte (Spritzen, Pipetten, Bechergläser etc.) selbst bei sauberstem Arbeiten die Ausschaltung aller bekannten Fehlerquellen ungemein erschwert, wenn nicht unmöglich macht, und daß sich kleine Fehler, wie z.B. Aktivitätsverluste aus verschiedenen Ursachen, unter Umständen im Laufe des Versuches gleichsinnig addieren. Auf der anderen Seite stehen diesen Fehlerquellen, die sich übersehen, vermeiden oder doch weitgehend ausschalten lassen, solche gegenüber, die nicht unmittelbar zu überblicken und daher im einzelnen nur sehr schwer zu kontrollieren sind.

Letzteres gilt in der Hauptsache von den durch radioaktives Material an verwendeten Laborgeräten verursachten Verunreinigungen. Im Gegensatz zu Präparaten mit harter β - oder γ -Strahlung läßt sich bei

weichen β -Strahlern von der Art des $^{16}\text{S}^{35}$ die Verseuchung nicht durch entsprechende Meßgeräte überwachen. Eine Weglänge von 1cm in Luft absorbiert 25%, eine solche von 10cm bereits 94% der Strahlung des Isotops, dichtere Materie wie Glas von Kolben, Reagenzgläsern etc. läßt keinerlei Strahlung mehr nach außen dringen. Die Reinigung hat daher weitgehend ohne Kontrolle zu erfolgen. Mehrtägiges Wässern, am besten in strömendem Wasser, bietet noch die beste Gewähr für ausreichende Entseuchung der Geräte. Auf diese Weise von vorher applizierten Präparaten gereinigte Glasplättchen zeigten einen Rückgang der Aktivität bis nahe auf den Nullwert. Zweckmäßig ist es, an das Wässern eine längere Lagerung der Geräte in Lösungen von inaktivem Sulfat, in verdünnter Chromschwefelsäure, in Laugen oder Säuren anzuschließen, soweit dies möglich ist. Obwohl wir sehr lange Zeiträume zur Reinigung der Geräte festlegten, traten immer wieder vereinzelt fehlerhafte Meßwerte auf, deren Zustandekommen sich letzten Endes wohl nur aus der unübersichtlichen Geräteentseuchung erklären ließ.

Andere Fehlerquellen waren leichter zu überblicken, wenn auch nicht weniger schwierig auszuschalten. Zu nennen ist die oft bei Blutentnahmen (aus der Dauerkanüle wie bei Einzelpunktionen) auftretende Schwierigkeit, das Abnehmen des Blutes auf einen möglichst kurzen Zeitraum (im allg. etwa 30 sec.) zu konzentrieren. Die Unmöglichkeit, bei allen zur Untersuchung gelangenden Patienten gut punktierbare Venen vorzufinden, häufiges teilweises oder völliges Kollabieren der Venen etc. brachten es mit sich, daß sich manche Blutentnahme über mehrere Minuten ausdehnte, sodaß etwa zu einem Zeitpunkt t entnommenes Blut mit einem sieben oder acht Minuten später entnommenen in einer Probe vorlag. Dies mußte ohne Korrektur im Kurvenbild zu Verfälschungen des Kurvenverlaufes Anlaß geben. Wir wählten daher bei solchen Proben (besonders, wenn es sich um Punkte im Bereich der Phase des initialen Abfalles handelte), bei denen es auf eine gleichmäßige Entnahme von Blut während eines längeren Zeitraumes ankam, einen Zeitpunkt, der dem Mittelwert zwischen Anfang und Ende der Entnahme entsprach. In anderen Fällen wurde der Zeitpunkt aufgetragen, an dem die überwiegende Menge der 5ml-Probe entnommen worden war. Die Verhältnisse gestalteten sich dabei ganz allgemein in der initialen Phase des Aktivitätsabfalles sehr

schwierig, weil hier ganz besonders auf eine rasche Blutentnahme geachtet werden mußte. Schon aus diesem Grund stellte die 5ml-Blutprobe ein Maximum dar.

Da von jeder Probe der gleiche Mengenanteil an Plasma zur Aufarbeitung gelangen sollte, mußte Konstanz von Volumen und Zusammensetzung dieser Menge gewährleistet werden. Ein geringer volumetrischer Fehler durch einmaliges Pipettieren ließ sich zwar sicher nicht ganz vermeiden, aber durch genaues Arbeiten doch weitgehend reduzieren. Die Gefahr einer Beeinträchtigung der Zusammensetzung war insofern gegeben, als bei einer Blutentnahme das als Antikoagulans in die Kanüle gespritzte Natriumcitrat zuerst wieder aufgesogen wurde. Daher war es nötig, eine dem injizierten Natriumcitrat adäquate Menge von Blutflüssigkeit zu verwerfen. Dies konnte naturgemäß nicht quantitativ, sondern nur nach Gutdünken geschehen.

Auch die Benützung einer Kanüle für mehrere Blutentnahmen muß als Fehlerquelle zumindest erwogen werden. Etwaiges, bei einer Entnahme an der Kanüle haften gebliebenes aktives Material könnte möglicherweise durch Verseuchung der nachfolgenden Probe eine höhere Aktivität vortäuschen als tatsächlich vorhanden. Freilich könnte sich ein solcher Fehler nur bei den beiden letzten Proben eines Versuches bemerkbar machen, die in allen Fällen durch gesondertes Punktieren gewonnen wurden. Bei den sieben vorausgehenden Werten bliebe dieser Fehler jedoch als konstanter Fehler für alle Versuche zu berücksichtigen, wodurch er an Bedeutung wieder verliert. Die Tatsache, daß die gesamte Menge des Sulfats nicht durch die Dauerkanüle, sondern gesondert injiziert wurde, sowie der Umstand, daß außerdem nach jeder Blutentnahme eine kurze Spülung der Kanüle mit Zitrat erfolgte, welches, soweit es sich in der Kanüle befand, vor Beginn der Abnahme der nächsten Proben wieder verworfen wurde, läßt die Wahrscheinlichkeit einer Beeinflussung der Meßwerte durch einen solchen Fehler doch als sehr gering erscheinen. Da der Großteil der Versuche unter Verwendung der Benzidin- oder Bariummethode durchgeführt wurde, seien noch einige mögliche Fehlerquellen dieser Methode erwähnt. So muß vor allen Dingen darauf geachtet werden, daß bei der Veraschung die Proben in keinem Augenblick des zwei Tage währenden Prozesses zur Trockne eingedampft werden. Während näm-

lich die Sulfat-Verdampfung der siedenden Lösung vernachlässigt werden darf, erfolgt bei starkem Erhitzen eines trockenen sulfat-Präparates Bildung von gasförmigem SO_2 , wodurch bei längerer Dauer unter Umständen ein beträchtlicher Verlust an radioaktiver Substanz entstehen könnte. Große Sorgfalt ist auch auf eine vollständige Durchführung des Veraschungsprozesses zu legen. Neben dem Auftreten von weißen Perchlorsäuredämpfen darf man ein Grünlichwerden der Lösung als Kriterium dafür ansehen, daß der Endpunkt der Oxydation erreicht ist. Auch unvollständige Veraschung resultiert in einem Substanzverlust. Die Notwendigkeit, diese veraschte, mit Spülwasser verdünnte Lösung auf ein kleines Volumen einzuengen, bringt die Gefahr des Verspritzens von Teilen der heftig siedenden Flüssigkeit mit sich. Man muß daher mit größter Vorsicht zu Werk gehen. Die Kontrolle des p_H -Wertes darf (wenn man kein p_H -Meßgerät zur Verfügung hat) nur mit kleinsten Stückchen Indikatorpapier vorgenommen werden. In der Zeit, in der man die erhaltenen Niederschläge stehen läßt, muß man dafür sorgen, daß die einzelnen Bechergläser abgedeckt werden. Eingedrungene Schmutzteile, Staub, Haare etc., ebenso wie gewisse, bei unvollständiger Veraschung anfallende Fällungsprodukte sammeln sich bei der Aufbereitung des Niederschlages wegen ihres geringen spezifischen Gewichtes an der Oberfläche der Präparate an und können Absorption von wechselndem Ausmaß verursachen.

Von der gründlichen Reinigung der Becherglaswände mit destilliertem Wasser und 70%igem Alkohol war schon die Rede. Nicht minder wichtig ist es, die Lösung mit dem Niederschlag sehr langsam und vorsichtig in den Glaszylinder des oben beschriebenen Apparates einfließen zu lassen, um eine mechanische Läsion des Filterpapiers zu verhindern. Dem gleichen Zweck dient das Unterlegen eines zweiten Filterpapiers, wodurch der starke Sog der Wasserstrahlpumpe gemindert und etwaige Schwankungen des Wasserdruckes aufgefangen werden, ohne daß es zu einer Beschädigung des zu oberst liegenden Filterpapiers kommt. Die Einführung dieses zweiten Filterpapiers brachte eine deutliche Besserung der Ergebnisse.

Eine erfolgreiche Messung der Präparate setzt schließlich eine ausreichende Kenntnis der Apparatur und ihrer Fehlerquellen voraus. Von den vielen Möglichkeiten seien nur die wichtigsten kurz erwähnt.

Die Wahl der Arbeitsspannung hat sich nach dem Plateau der Zählrohrcharakteristik zu richten; wählt man einen Spannungswert aus der Mitte dieses Konstanzbereiches, so zeigen Schwankungen der Spannung während der oft mehrstündigen Messung keinen wesentlichen Einfluß auf die gemessenen Impulszahlen. Trotzdem ist eine ständige Kontrolle der Spannung unerlässlich. Ratsam ist es auch, sich durch möglichst häufige Stichproben vom Funktionieren der Zählröhren zu überzeugen. Selbst ein geringfügiges "Springen" einer Röhre kann das Meßergebnis weitgehend verfälschen. Ein spezifisches Problem des Methandurchflußzählers stellt die Aufrechterhaltung eines kontinuierlichen Gasflusses dar. Dazu ist vor Beginn der Messung ein etwa halbstündiges Durchströmen der Zelle bei abgeschalteter Spannung erforderlich. Ein noch so geringes Eindringen von Luft kann zu einem sprunghaften Ansteigen der Impulse führen. Bei Präparaten, die wegen zu hoher Impulswerte aus der Reihe fallen, empfiehlt es sich daher, zunächst einmal den Gasstrom durch die Zählkammer zu kontrollieren. Der Apparat sollte nur von Methangasflaschen mit ausreichendem Druck beschickt werden, da mit den letzten Resten der Füllung häufig störende Luftbeimischungen in die Zählkammer gelangen. Gelegentliche Überprüfung des Nullwertes während der Messung ist angebracht, um etwaige, während der Messung auftretende Verunreinigungen des Zählgerätes zu erfassen.

Die stärksten Beeinträchtigungen der Ergebnisse mußten bei der Bestimmung der Schwefel-Urinausscheidung in Kauf genommen werden. Mehrtägiges Sammeln des Urins durch teilweise alte und gebrechliche Patienten ohne Anwendung eines Katheters kann naturgemäß keine quantitativen Ergebnisse liefern. Die erhaltenen Werte können daher nur ein grobes Bild vom Verlauf der Schwefel-Ausscheidung geben.

E r g e b n i s s e .

1) Kaninchen.

Zur Prüfung der Anwendbarkeit der erläuterten Methode, insbesondere der Glasplättchenmethode, wurde fünf Kaninchen eine Strahlendosis von jeweils 100 μ C injiziert. Vier von den Tieren waren gesund und aus-

gewachsen, ein fünftes, junges, dem die Suspension eines Brown-Pearce-Tumors in beide Hoden injiziert worden war, wies zahlreiche, deutlich palpable Netzmetastasen auf. Die Aufzeichnung der abfallenden Serumaktivität lieferte Kurven, die sich in der graphischen Darstellung bei Verwendung eines logarithmischen Maßstabes für die Ordinate als aus zwei, meistens aber aus drei Strecken zusammengesetzt erwiesen. Tabelle I zeigt eine Zusammenstellung der aus den einzelnen Abschnitten berechneten Verschwinderraten k_1, k_2, k_3 . Wo k_2 fehlte, wurde der zweite Abschnitt mit k_3 bezeichnet. Aus den erhaltenen Werten ebenso wie aus den ihnen zugrunde liegenden Kurvenbildern (vgl. Anhang) läßt sich ein, innerhalb eines gewissen Schwankungsbereiches konstanter, charakteristischer Verlauf des Verschwindens der Aktivität aus dem Blut erkennen, wie es nach den Angaben in der Literatur zu erwarten stand. Gleichzeitig liefern die Werte einen Beweis für die Anwendbarkeit dieser Methode im Rahmen gewisser, oben diskutierter Grenzen.

Tabelle I

Verschwinderrate der Serumaktivität bei 5 Kaninchen

4 Normalfälle, 1 Tumorkaninchen

Versuchstier	k_1	k_2	k_3	Aktivität nach 5 Std. in % des 4-Minutenwertes
K_1	- 0,0040	- 0,0016	- 0,00014	51
K_2	- 0,0051	-	- 0,00038	57
K_3	- 0,0036	- 0,0007	- 0,00002	56
K_4	- 0,0047	- 0,0011	- 0,00019	60
	- 0,0043	- 0,0011	- 0,00018	56 ± 2
m	± 0,0004	± 0,0003	± 0,00007	
$K_5(T)$	- 0,0105	- 0,0008	- 0,00032	51

Obwohl aus der Gegenüberstellung von physiologischem und pathologischem Geschehen mangels Vorliegens einer mindestens adäquaten Zahl untersuchter Tumorkaninchen keine beweiskräftigen Schlüsse gezogen werden können, findet man beim Vergleich von K_1 - K_4 mit K_5 einen Unterschied in Form einer deutlichen Zunahme der Steigerung des ersten Kurvenstückes im Falle des Tumorkaninchens. Dieses Ergebnis deckt sich mit den beim Menschen erhaltenen Resultaten. Interessant ist auch, daß die Mittelwerte der Normalfälle bei Mensch und Kaninchen im Großen und Ganzen gute Übereinstimmung zeigen.

Die Zeiten, die zur Einstellung des Diffusionsgleichgewichtes beim Kaninchen erforderlich sind, schwanken zwischen 18 und 40 Minuten; am schnellsten war diese Einstellung bei K_5 erreicht, was möglicherweise mit der geringen Ausdehnung des extracellulären Raumes beim jungen Tier zusammenhängt. Die Frage, ob die Dreiteilung der Kurve in jedem Fall vorhanden sein muß und ihre Darstellung von der Güte der Methode und der mehr oder weniger erfolgreichen Ausschaltung der Fehlerquellen abhängt, oder ob hier ein individuelles Stoffwechselgeschehen seinen Ausdruck findet, konnte durch unsere Versuche weder für den Menschen noch für das Tier geklärt werden. (Kurvenbeispiele s. Anhang.)

2) Mensch.

Die Ergebnisse der Untersuchungen an 13 Patienten sind in den Tabellen IIa und IIb zusammengestellt. Bei 10 Fällen ergab sich ein dreiteiliger Verlauf der Kurve; die Steigungen der einzelnen Kurvenabschnitte sind mit k_1 , k_2 , k_3 bezeichnet. Auch die hier erhaltenen, nach mehreren Methoden des Schwefelnachweises gewonnenen Kurvenbilder (vgl. Anhang) zeigen einen typischen Verlauf. Daß die Verschiedenheit der Methoden keinen merklichen nachteiligen Einfluß auf diesen Verlauf hatte, erkennt man beim Betrachten der mittleren Fehler der Steigungen. Mit 1,0%-25% in Tabelle IIa liegen sie eher noch niedriger als bei den Werten der methodisch einheitlich durchgeführten Versuche am Kaninchen, wo die Mittelwerte mit Fehlern von 9% -39% behaftet sind.

Bei Betrachtung der Kurven und einem Vergleich der in den beiden Tabellen aufgeführten Werte gelangt man zu folgenden Ergebnissen:

Tabelle IIa

Verschwinderrate (k_1, k_2, k_3) der Serumaktivität beim Menschen
6 "Normalfälle" (m = Mittelwert)

Pat.	k_1	k_2	k_3	Aktivität nach 5 Std., in % des 4-Minuten-Wertes
B.A.	- 0,0073	-	- 0,00084	41
H.G.	- 0,0050	-	- 0,00032	54
G.A.	- 0,0061	- 0,0028	- 0,00149	28
F.F.	- 0,0048	- 0,0018	- 0,00020	52
W.M.	- 0,0088	- 0,0020	- 0,00097	30
K.W.	- 0,0052	- 0,0012	- 0,00043	54
	- 0,0062	- 0,0019	- 0,00071	43 ± 5
m	± 0,0006	± 0,0003	± 0,00018	

Tabelle IIb

Verschwinderrate (k_1, k_2, k_3) der Serumaktivität beim Menschen
7 Patienten mit malignen Tumoren

Pat.	Tumor	k_1	k_2	k_3	Aktivität nach 5 Std., in % des 4-Minuten-Wertes
K.J.	Larynx-CA	- 0,0079	- 0,0007	- 0,00008	55
H.H.	Bronch.-CA	- 0,0074	- 0,0020	- 0,00032	45
C.D.	Rectum-CA	- 0,0376	- 0,0018	- 0,00244	22
F.C.	Ovar.-Tum.	- 0,0205	- 0,0014	- 0,00040	22
S.I.	Larynx-CA	- 0,0204	-	- 0,00057	38
S.E.	Mamaneopl.	- 0,0157	- 0,0024	- 0,00000	35
A.J.	Bronch.-CA	- 0,0060	- 0,0014	- 0,00044	51
		- 0,0165	- 0,0016	- 0,00046	38 ± 5
m		± 0,0049	± 0,0002	± 0,00018	

- a) Die Werte von k_1 sind bei den Tumorfällen im Mittel um das 2,6-fache gegenüber denen bei Normalfällen erhöht.
- b) k_2 zeigt in den Tabellen IIa und IIb annähernd gleiche Werte. Allenfalls läßt sich beim Malignomkranken eine geringfügige Abnahme der Steigung feststellen, die aber bei Berücksichtigung der Fehlergrenzen als irrelevant anzusehen ist.
- c) k_3 ist beim Tumorkranken um das 1,5fache des Normalwertes gesenkt.
- d) Nach 5 Stunden fand sich im Blut eine Aktivität, die beim Normalfall 43%, beim Kranken 38% (Mittelwerte) der vier Minuten nach Injektion gemessenen Initialaktivität betrug. Diese Werte unterscheiden sich nur geringfügig voneinander. Offenbar wird der im k_1 -Bereich beim Tumorkranken stattfindende größere Aktivitätsabfall in Phase 3 durch ein im Vergleich zum Normalfall langsames Absinken kompensiert.
- e) Die durch k_1 bezeichnete Initialphase ist im Normalfall im Mittel nach 24 ± 3 Minuten, beim Malignomkranken nach 19 ± 2 Minuten abgeschlossen. Diese Ergebnisse stimmen für Normalfälle mit den Angaben in der Literatur ungefähr überein. Soweit eine zweite Phase, durch k_2 gekennzeichnet, abgegrenzt werden konnte, ging sie im Normalfall nach 10 ± 1 Minuten, beim Malignomkranken prolongiert nach 119 ± 17 Minuten in die Schlußphase (k_3) über.

Für diagnostische Zwecke wäre vor allem die unter a) erwähnte erhöhte Steigung der Initialphase von Bedeutung. Zum besseren Verständnis der Ergebnisse seien hier noch die einzelnen Fälle klinisch und methodisch kurz bezeichnet. (Vgl. Beilage.)

1) Normalfälle:

- B.A., w., 61 Jahre. Die Patientin wurde wegen Ischialgie bei Bandscheibenschaden stationär aufgenommen. Schwefel-Nachweis als BaSO_4 .
- H.G., m., 72 J. Arterielle Durchblutungsstörung am linken Bein. Schwefelnachweis direkt aus dem Plasma, das auf Filterpapierschichten aufgetragen wurde. Werte 6 und 7 zeigen starke Streuung (möglicherweise infolge Wellung des Filterpapiers nach dem Trocknen).
- G.A., w., 55 J. Retrosternale Struma nodosa, kein maligner Befund. Schwefel als Benzidinsulfat gefällt. Auffallend der steile Abfall der dritten Phase, der in diesem Grade nur bei dieser Kurve auftrat.

F.F.,m.,44 J. Zustand nach angiospastischem Insult, Hypertonie.

Schwefel als Benzidinsulfat gefällt.

W.M.,w.,59 J. Emphysem, chronischer Alkoholismus. Schwefel als Benzidinsulfat.

K.W.,w.,51 J. Osteochondrose der BWS und LWS, chronische Colitis.

Aus der Anamnese der Patientin ist eine 1938 vorgenommene ablatio mammae und ein operiertes Collum-CA zu erwähnen. Zur Zeit des Versuches war kein maligner Befund zu erheben. Die Kurve zeigt einen für Normalfälle typischen Verlauf; der Schlußteil ist infolge großer Streuung der beiden letzten Werte nur ungefähr, auf die bestmögliche Weise, eingezeichnet worden. Schwefel als Bariumsulfat.

2) Malignomkranke:

K.J.,50 J. Exophytisch wachsendes, nichtverhornendes Plattenepithel-

carcinom des rechten Stimmbandes, wahrscheinlich Metastasen in die rechte Halslymphdrüse. Schwefel als Bariumsulfat gefällt.

Der vorletzte Wert ist mit großer Wahrscheinlichkeit durch Fehlerquellen verfälscht.

H.H.,m.,62 J. Bronchial-CA mit zahlreichen, über beide Lungen ver-

streuten Metastasen. Schwefel als Bariumsulfat gefällt. Der Verlauf ist atypisch und gleicht eher dem einer Normalkurve; auffallend ist die Übereinstimmung dieses Ergebnisses mit dem des letzten Falles dieser Reihe. Möglicherweise ist hier der geringe Grad der Mitbeteiligung des Mesenchyms (carcinoma solidum) von Einfluß.

C.D.,m.,27 J. Operiertes rectum-CA, neuerliches Rezidiv mit Übergreifen

auf die Blase. Schwefelnachweis direkt aus dem Plasma, das auf Glasplättchen aufgetragen wurde. Wert 5, ebenso wie Wert 4 beim nächsten und Wert 3 beim letzten Fall dieser Reihe, fällt aus dem Rahmen. Der 5-Stunden-Wert war nicht verwendbar. Zur Bestimmung der Rest-Aktivität wurde die Gerade verlängert. Starker initialer Abfall.

F.C.,w.,74 J. Pleuritis carcinomatosa bei Ovarialtumor. Schwefel als

Bariumsulfat gefällt. Starker initialer Abfall, verlängerte Phase 2.

S.J.,m.,55 J. Larynx-CA (Plattenepithelcarcinom), Zustand nach Tracheotomie. Vgl. K.J. oben. Hier betonter Abfall der Aktivität in Phase 1. Schwefel als Bariumsulfat gefällt.

S.E.,w.,67 J. Neoplasma der mamma, cancer en cuirasse. Die Kurve zeigt die stärksten Veränderungen gegenüber dem Normalfall. k_1 und k_2 sind hier beide erhöht. Auffallend das Plateau der Schlußphase. Das signifikante Ergebnis läßt sich vielleicht durch die starke Beteiligung bindegewebiger Bestandteile erklären. Schwefel als Benzidinsulfat gefällt.

A.J.,m., 54 J. Bronchial-CA rechts mit Rippenmetastasen links. Vgl. die Kurve von H.H. oben, die einen ähnlichen Verlauf zeigt. Schwefelnachweis direkt aus dem Plasma, Glasplättchenmethode.

Die Unterschiede zum Normalfall waren am augenfälligsten beim mamma-Karzinom, Rectum-CA und Ovarial-CA mit Pleuritis carcinomatosa. Eine ausgeprägte Zunahme der Steilheit der Initialphase zeigte sich auch bei zwei Fällen von Larynx-CA. Zwei weitere Fälle von Bronchial-CA wiesen dagegen keine Abweichungen vom Normalfall auf. Ganz allgemein kann man feststellen, daß die Normalkurve flacher verläuft als die Kurve beim Tumorkranken.

3) Ausscheidung.

Die Schwefelausscheidung im Urin wurde beim Menschen über vier Tage verfolgt. Von jeder Tagesmenge wurde eine Probe entnommen, welche im fertigen Präparat eine hinreichende Aktivität lieferte. Die Aufbereitung erfolgte analog der für Blutplasma bei der Schilderung der einzelnen Methoden beschriebenen Weise. Die graphische Darstellung (s. Anhang) zeigt die Ausscheidung des Schwefels in % der injizierten Dosis als Funktion der Zeit in 9 von 13 Fällen (bei den restlichen vier Personen waren es technische Schwierigkeiten oder zu kurzer Klinikaufenthalt, welche die Ermittlung der Urinausscheidung nicht gestatteten). Den Berechnungen liegen entweder (bei der Glasplättchen- und Filterpapiermethode) Absolutmessungen oder (bei der Fällung als schwerlösliches Salz) Relativmessungen zugrunde. Bei ersterer wird das Verhältnis der vom Zählgerät registrierten Impulsrate eines Prä-

parates zu der in ihm tatsächlich enthaltenen Strahlungsmenge bestimmt. Bei der Relativmessung wird dagegen ein bekannter Volumanteil der injizierten Sulfatlösung zurückbehalten und gesondert aufbereitet.

Die berechneten Werte liegen zum Teil erheblich unter den in der Literatur bisher diskutierten. B o r s o k verfütterte $\text{Na}_2\text{S}^{35}\text{O}_4$ an Tiere und fand in den ersten 24 Stunden eine Ausscheidung von 47% der injizierten Dosis, in den beiden folgenden Tagen dagegen keinen bestimmbareren Betrag. S c h l ü s s e l (45) kam nach oraler Verabreichung von S^{35} -markiertem Schwefel an Menschen zu dem Ergebnis, daß die Hauptmenge in 36-48 Stunden nach Hefegabe durch den Urin ausgeschieden wird. D z i e w i a t k o w s k i (8) konnte bei Injektion von $\text{Na}_2\text{S}^{35}\text{O}_4$ an Ratten nach 120 Stunden 85% des Schwefels in Urin und Faeces nachweisen. L e w i s o n et alii (30) schließlich injizierten acht Patienten S^{35} -markiertes Natriumöstronsulfat bzw. Natriumsulfat und ermittelten eine Ausscheidungsrate von 69,9 - 99,1% in 72 Stunden. Da bei unseren Versuchen kein Katheterharn zur Verwendung gelangte, können die Ergebnisse keinen Anspruch auf größte Genauigkeit erheben. Außerdem erschwerten es fortgeschrittenes Alter, Gebrechlichkeit und Krankheit den Patienten, die erbetene Akribie beim Sammeln des Urins walten zu lassen. Man muß daher bei der Auswertung und Beurteilung der Ergebnisse sehr vorsichtig sein. Auf jeden Fall zeigt die graphische Darstellung der Ausscheidungsrate, daß die größte Ausscheidung innerhalb von 48 Stunden stattfindet. Nach dieser Zeit liegen 19-82,5% der injizierten Dosis im Urin vor, nach 72 Stunden sind es dagegen nur unwesentlich erhöhte Werte: 20-89%; ebenso nach 96 Stunden, wo 29-93,5% ausgeschieden sind. Bei flüchtiger Betrachtung könnte man zu dem Ergebnis kommen, daß die Ausscheidung in den ersten 8 Stunden beim Tumorkranken gegenüber der beim Normalfall erhöht ist. Der Mittelwert von 24,5% gegenüber 17% beim Normalen scheint zumindest diesen Schluß zu bestätigen. Doch ist eigentlich nur ein einziger Wert eines Tumorkranken über dem der höchsten 8-Stunden-Ausscheidungsrate eines Gesunden gelegen. Umgekehrt dagegen ist es auch ein Tumorkranker, der mit 5% die geringste 8-Stunden-Ausscheidung aufweist. Doch sind die Werte beim Tumorkranken weder so gleichmäßig noch auffällig genug erhöht, als daß man die schon mehrfach erwähnten Fehlerquellen, die hier ein

falsches Bild vortäuschen können, einfach unberücksichtigt lassen dürfte. Man wird also gut daran tun, die geringe Steigung der Ausscheidungsrate (innerhalb 8 Stunden) beim Kranken zwar zu notieren, ihr aber keine wesentliche Beweiskraft zuzuschreiben.

D i s k u s s i o n .

Bei der Beurteilung der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, daß die Grenzen dieser Arbeit - nicht zuletzt infolge methodischer Schwierigkeiten - durch die Beschränkung auf wenige Fälle relativ eng gesteckt waren. Erst statistische Untersuchungen an einer großen Anzahl von Fällen können endgültig über den Gültigkeitsbereich der hier berichteten Resultate entscheiden. Für die von uns untersuchten Fälle halten wir, bei aller Vorsicht und Berücksichtigung von Fehlerquellen, das Vorliegen eines Unterschiedes zwischen den Kurvenbildern Gesunder und denen Malignomkranker für erwiesen. Markant ist vor allen Dingen die Steigungszunahme der Initialphase beim Tumorkranken. Wenn sich auch, besonders bei den Patienten mit Bronchialkarzinomen, die Steigungen wenig von den Werten der Normalfälle unterscheiden, so findet sich doch umgekehrt unter den letzteren keiner, der einen ähnlich hohen Wert für k_1 aufzuweisen hätte wie die tumorkranken Patienten. Dem Einwand, die Ergebnisse seien inkommensurabel, da sie nach verschiedenen Methoden der Schwefelaufbereitung gewonnen worden seien, glauben wir durch den Hinweis auf die mit gleichen Fehlern behafteten Werte bei den methodisch einheitlichen Untersuchungen am Kaninchen einerseits, bei den Untersuchungen mit verschiedener Aufbereitung am Menschen andererseits entkräften zu können. Jede der verwandten Methoden vermochte grundsätzlich den Verlauf des Abfalls der Plasmaaktivität zu erfassen. Da es sich bei allen Messungen der letzteren um Relativmessungen handelte, bei denen es nur auf das Verhältnis der einzelnen Werte zueinander ankommt, nicht aber auf absolute Größenangaben, waren die Voraussetzungen für eine Verfälschung und Abwandlung des Kurvenverlaufes durch teilweise modifizierte Methodik nicht gegeben. (Etwaige besondere Fehlerquellen, die einer bestimmten Methode anhaften können,

hätten jeden einzelnen Wert betroffen, wodurch sie wiederum nach außen nicht in Erscheinung getreten wären.) Über die Ursachen, die den von uns beobachteten Veränderungen im Verlauf des Abfalls der Plasmaaktivität zugrunde liegen, konnten wir im Rahmen dieser Arbeit keine beweiskräftigen Aufschlüsse erhalten. Die experimentelle Bestätigung von Hypothesen, die in diesem Zusammenhang aufgestellt werden können, steht noch aus. Über die Verwendung von exogen zugeführtem Schwefel (als SO_4) im Organismus wurde bereits in der Einleitung berichtet. Bei der Deutung unserer Ergebnisse handelt es sich um die Klärung der Frage, ob die festgestellten Veränderungen den Schwefelstoffwechsel des Tumorkranken betreffen oder durch einen anderen tumorspezifischen Prozeß zu erklären sind. Zunächst fällt auf, daß die erhöhte Verschwinderrate beim Tumorkranken nur den Initialteil betrifft. Diese Phase bezeichnet nach übereinstimmenden Ergebnissen mehrerer Autoren diejenige Zeit, innerhalb welcher sich das Sulfat in der ganzen extracellulären Flüssigkeit ausbreitet. Die Einstellung des Diffusionsgleichgewichtes zwischen Interstitium und Blutgefäßsystem war dabei im Normalfall nach 24 Minuten, beim Tumorkranken beschleunigt nach 19 Minuten abgeschlossen. Ein verstärktes Absinken der Radioaktivität in diesem Zeitraum kann ganz allgemein entweder durch eine erhöhte Ausscheidung von Sulfat im Urin oder durch einen gesteigerten Abtransport in die interstitielle Gewebsflüssigkeit zustande kommen.

1) Erhöhte Sulfatausscheidung im Urin.

Diese Möglichkeit liegt zumindest nahe. Auf die Bedenklichkeit, sie ohne weiteres als Tatsache hinzunehmen, wurde auf S. 36 hingewiesen. Daß zwischen dem Verschwinden der Aktivität im Blut und dem Verlauf der Ausscheidung des Stoffes im Urin bestimmte Beziehungen bestehen, ist erwiesen. Doch kann man den Abfall der Plasmaaktivität nicht unbedingt mit der Zunahme des Stoffes im Urin gleichsetzen, denn der Verlauf des ersteren gibt, wie W a l s e r (38) bemerkt, "die Gesamtheit des Verlustes sowohl durch Exkretion als auch durch eine andere, davon gesonderte exponentielle Verschwinderrate wieder". Die im Diagramm sichtbare, geringfügig gesteigerte Ausscheidung beim Tumorkranken bezieht sich auf den 8-Stunden-Urin. Demgegenüber zeigen

Tabelle IIa und IIb, daß die nach 5 Stunden im Blut auftretende Aktivität beim Tumorkranken mit $38 \pm 5\%$ des 4-Minutenwertes gegenüber $43 \pm 5\%$ beim Normalfall unter Berücksichtigung der Fehlerbreite praktisch als unverändert bezeichnet werden muß. Trotzdem muß man die Möglichkeit einer erhöhten Ausscheidung erwägen. Als Ursache kommen mehrere Faktoren in Frage. Für einen bei den untersuchten nichttumorkranken Patienten vorliegenden Nierenschaden mit Retention des Sulfats liegen freilich weder Befunde noch anamnestische Anhaltspunkte vor. Eine erhöhte Schwefelausscheidung infolge des erhöhten momentanen Angebotes müßte Personen mit und ohne Neoplasma in gleicher Weise betreffen. Denkbar wäre eine zu Entgiftungszwecken erfolgende Anreicherung des Sulfats in der Leber, Koppelung an eventuell vermehrte Abbauprodukte und rasche Ausscheidung im Harn. Für eine derartige Annahme liegen aber keine Beweise vor.

2) Gesteigerter Abtransport in das Interstitium.

a) Eröffnung neuer Unterabteilungen des extracellulären Flüssigkeitsraumes: Die Anschauungen über die Bestandteile des extracellulären Flüssigkeitsraumes schwanken. Gewöhnlich versteht man darunter den Blut- und Lymphgefäßraum und die gesamte, nicht innerhalb von Zellmembranen befindliche Gewebsflüssigkeit. W a l s e r (38) unterscheidet transcelluläres Wasser (vgl. S. 12), funktionslose Flüssigkeit (der Teil, der in keinem Diffusionsgleichgewicht mit anderen Teilen zu stehen scheint, hauptsächlich das BG-Wasser) und funktionelle Flüssigkeit. Der Autor behauptet, beim Gesunden sei der von Stoffen wie Sulfat, Thiosulfat und Inulin während der Initialphase überflutete Raum mit der letztgenannten Flüssigkeit identisch. R y a n und Mitarbeiter (39), der umfangreiche Studien über die Bestimmung des extracellulären Flüssigkeitsraumes mit S^{35} -markiertem Sulfat vornahm, gesteht ein, mangels ausreichender Daten genaue Aussagen über das Verhältnis des Sulfat-Raumes zu einem anatomisch definierten extracellulären Flüssigkeitsraum nicht machen zu können. Man muß daher die Möglichkeit einer Eröffnung zusätzlicher Unterabteilungen der extracellulären Flüssigkeit beim Tumorkranken in Betracht ziehen; bei Annahme eines gesteigerten SO_4 -Bedarfs wäre dabei vor allem an die von Walser

erwähnte funktionslose Flüssigkeit zu denken. Schließlich käme auch eine Vergrößerung des extracellulären Raumes und ein damit verbundener, gesteigerter Abstrom ins Interstitium infolge vermehrter Vascularisierung im Tumorgebiet (besonders beim Vorliegen von Metastasen) in Frage.

b) Störungen im Flüssigkeits- und Elektrolytaustausch von Blut und Gewebe: Der Mechanismus des Austausches von Wasser und löslichen Substanzen zwischen Blutgefäßen und Interstitium, wie er sich in der Zeit bis zur Einstellung eines Diffusionsgleichgewichtes abspielt, ist nichtsdestoweniger mit dem Wort "Diffusion" in keiner Weise ausreichend beschrieben. Würde es sich einfach um Diffusion handeln, so wäre die Austauschgeschwindigkeit eines Stoffes durch die Kapillarswand seinem Konzentrationsgefälle proportional. In Wirklichkeit wird jedoch die Bewegung der Elektrolyte durch hämodynamische (Kapillardruck) und physikalisch-chemische Kräfte reguliert. Zu letzteren gehören der kolloid-osmotische oder onkotische Druck, der dem Kapillardruck entgegenwirkt, und die Gesetzmäßigkeiten der anormalen Osmose, die zur Einstellung eines Donnan-Gleichgewichtes diesseits und jenseits der semipermeablen Kapillarswand (für Eiweiß undurchlässig, für größere Moleküle und alle Ionen durchlässig) führen. Veränderungen des onkotischen Druckes, wie sie gelegentlich bei fortgeschrittenen Fällen von Krebskachexie infolge einer mehr oder weniger hochgradigen Hypoproteinämie auftreten, bewirken eine verstärkte Flüssigkeitsretention im Interstitium (allerdings konnten wir bei unseren Patienten eine Kachexie nur im einen oder anderen Fall beobachten). Doch könnten auch Veränderungen des Donnan-Gleichgewichtes unbekannter Genese ein verstärktes Abwandern von SO_4 -Ionen ins Interstitium zur Folge haben.

c) Vermehrter Einbau des SO_4 -Ions in Körperzellen vom Interstitium aus: Die kurze Dauer der Initialphase läßt einen verstärkten Einbau oder Umbau des SO_4 -Ions in Aminosäuren bzw. Körperzellen nicht wahrscheinlich erscheinen. Auffällig ist, daß die nach M a u r e r (34) für den Einbau verantwortliche zweite Phase des Verschwindens der Plasmaaktivität beim Tumorkranken eher gesenkt als erhöht erscheint, und daß auch K_3 gegenüber dem Normalfall im Mittel eindeutig ernie-

drigt ist. Diese Tatsache muß nicht gegen einen Einbau sprechen, der vielleicht erst in einem späteren Zeitpunkt voll einsetzt. Eine Klärung dieser Frage könnten erst über mehrere Tage sich erstreckende, vergleichende Messungen der Plasmaaktivität bei Gesunden und Tumorkranken bringen. Andererseits ist beim Gesunden ein, freilich geringfügiges, Eindringen des Sulfats in Körperzellen auch für den Zeitraum der Ausbreitung im Interstitium nachgewiesen worden. Bei der Berechnung des Volumens der extracellulären Flüssigkeit (ca. 15% des Körpergewichtes) veranschlagte Walser den durch Zellpenetration des Sulfats in der Initialphase entstandenen Fehler mit ca. 0,5% des Körpergewichtes. Der erhöhte Wert von k_1 könnte also auch theoretisch auf einen beträchtlich gesteigerten Sulfateinbau in Körperzellen zurückzuführen sein. Indessen ist es etwas unwahrscheinlich, daß sich ein derartiger Vorgang nur auf diese Phase beschränken bzw. gerade in ihr sein Maximum erreichen sollte. Weil die interstitielle Flüssigkeit, von der aus das Eindringen des Sulfats in die Körperzellen erfolgen muß, während der Einstellung des Diffusionsgleichgewichtes wesentlich weniger SO_4 enthält als in der Zeit danach, wird normalerweise der Bruchteil, der während dieser Zeit in die Körperzelle eingebaut wird, etwas weniger betragen als während eines späteren, gleichlangen Zeitabschnittes.

Über die Verwendungsmöglichkeit der Methode in der Tumordiagnostik kann nach den Ergebnissen dieser Arbeit kein abschließendes Urteil gefällt werden. Bis zu einer endgültigen Entscheidung darüber müßte die Reproduzierbarkeit des Effektes für eine größere Zahl von Fällen nachgewiesen und geklärt werden, welche Tumorarten ihn bevorzugt zeigen. Nach unseren Beobachtungen trifft dies am ehesten für bindegewebsreiche Geschwülste zu. Dies stünde in gutem Einklang mit den im ersten Teil geschilderten Ergebnissen auf dem Gebiet des Schwefelstoffwechsels. Einer weiteren Klärung bedarf die Frage, ob und welche anderen pathologischen Vorgänge hier interferieren können, ein Problem, dessen Lösung eng mit dem Zustandekommen des Effektes verknüpft ist. Wie bereits erwähnt, sind hier alle Arten von regenerativen Prozessen, heilende Wunden, physiologische und pathologische Wachstumsprozesse, benigne Geschwülste, Prozesse, die mit einer hohen Bindegewebsproli-

feration einhergehen, ebenso Arteriosklerose etc. zu nennen.

Schließlich ist zu bedenken, daß der beträchtliche technische Aufwand, den die Durchführung der Methode erfordert, ihre Anwendbarkeit von vornherein auf die mit modernsten Einrichtungen ausgerüstete Klinik beschränkt. Und auch hier dürfte sie praktisch nur von Wert sein, wo sie sich in der Diagnostik, besonders von Frühfällen, den schon verfügbaren Methoden überlegen erweist.

Z u s a m m e n f a s s u n g .

1. Ausgehend von der Tatsache, daß anorganisches Sulfat als Bestandteil bindegewebiger Substanzen bei verschiedenen, normalen und excessiven Wachstums- und Regenerationsprozessen eine wichtige Rolle spielt, wurde eine experimentelle Klärung der Frage versucht, ob es mit Hilfe radioaktiven Schwefels, als anorganisches Sulfat verabreicht, grundsätzlich möglich sei, den Nachweis für das Vorliegen eines malignen Prozesses zu erbringen.

2. Bei 7 Patienten mit histologisch gesichertem CA und 6 Normalfällen wurde das Verschwinden einer i.v. injizierten Menge von S^{35} -markiertem Sulfat aus dem Blut gemessen. Dazu wurden während eines Zeitraumes von 5 Stunden mit Hilfe einer Dauerkanüle mehrere Blutproben entnommen. Es werden mehrere zum Nachweis des Schwefels benutzte Methoden beschrieben, die der verlustlosen homogenen Aufbereitung der Plasmaproben in Aluminium-Präparateschälchen dienen. Zur Bestimmung der Schwefelausscheidung wurde der Urin vier Tage lang gesammelt, und Proben nach den gleichen Methoden aufbereitet. Die mit einem Methandurchflußzähler (FH 51) gemessenen Werte lagen auf Kurven mit verschiedenen exponentiellen Abschnitten. Bei Benutzung einer logarithmischen Einteilung der Ordinate erhält man eine Kurve, die sich aus drei Strecken zusammensetzt. Die Steigungen der einzelnen Strecken werden mit k_1 , k_2 und k_3 bezeichnet. Die Durchführbarkeit der Versuchsanordnung wurde in Vorversuchen an 5 Kaninchen erprobt, von denen eines einen Brown-Pearce-Tumor aufwies.

3. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Zunahme der Steigung des ersten Kurvenabschnittes beim Tumorkranken. Mit Ausnahme eines Falles lagen alle Werte von k_1 über denen der Normalfälle. Im Mittel betrug die Zunahme das 2,6fache. Die Unterschiede waren am ausgeprägtesten beim mamma-CA, rectum-CA und Ovarial-CA. Während die Werte von k_2 nicht nennenswert differierten, war k_3 beim Tumorkranken um das 1,5fache gegenüber den Normalfällen gesenkt. Die Hauptausscheidung erfolgte in den ersten 48 Stunden. Der 8-Stunden-Urin zeigte beim Tumorkranken mit 24,5% der injizierten Dosis eine geringfügige Erhöhung gegenüber 17% im Normalfall.

4. Die Ergebnisse geben keinen beweiskräftigen Aufschluß über die Ursache des erhöhten Aktivitätsabfalles in der Initialphase. Da in diesem Stadium die Ausbreitung der injizierten Substanz über den extracellulären Flüssigkeitsraum erfolgt, ist ein verstärktes Eindringen in Körperzellen zwar denkbar, aber unwahrscheinlich. Möglicherweise findet beim Tumorkranken eine erhöhte Ausscheidung von Sulfat statt, das im Organismus zur Entgiftung an vermehrte Abbauprodukte gekoppelt wurde. Auch an eine Eröffnung normalerweise sulfatfreier Unterabteilungen des extracellulären Flüssigkeitsraumes muß gedacht werden.

5. Über die Verwendbarkeit der Methode in der Tumordiagnostik und ihren Anwendungsbereich kann erst nach Untersuchungen einer größeren Zahl von Patienten mit verschiedenartigen malignen Tumoren sowie nach Prüfung von Krankheitsbildern, die einen ähnlichen Effekt zeigen, endgültig geurteilt werden.

III.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

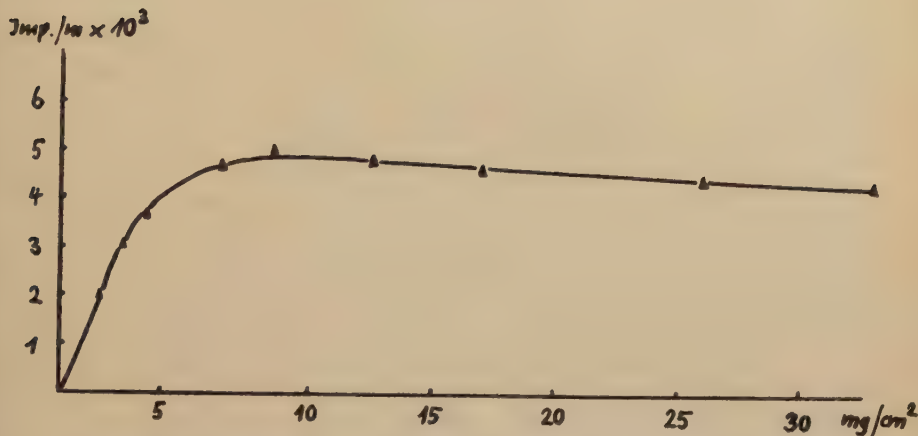
1. H.C.Cramer und H.W.Pabst: Tumordiagnostik mit P^{32} . Anwendungsmöglichkeiten und Grenzen. Münchn.Med.Wschr.30/1951
2. H.Cramer, C.Bilmeyer und H.W.Pabst: Tumordiagnostik durch selektive Speicherung von Radiophosphor, Natriumfluorescein und Atrebin. Schweiz.Med.Wochenschr. 82.Jhrg. Nr.4(76)/1952
3. H. Cramer und H.W.Pabst: Tumordiagnostik mit radioaktiven Isotopen. Zschr.f.Krebsforschung Bd.58(163)/1952
4. Th.Bersin: aus "Künstliche Radioaktive Isotope in Physiologie, Diagnostik und Therapie", redigiert von H.Schwiegk.
5. J.R.Geigy: Wissenschaftliche Tabellen, Basel, 1953
6. J.C.Laidlaw, L.Young: A Study on Ethereal Sulfate Formation in vivo Using Radioaktiv Sulfur. Biochem.J.54(142)/1953
7. D.Dziewiatkowski: J.of Biol.Chemistry 178,389/1949
8. D.Dziewiatkowski: J.of Biol.Chemistry 178,197/1949
9. D.Dziewiatkowski: Isolation of Chondroitin Sulfate from Articular Cartilage of Rats. J.of Biol.Chem.189(187)/1951
10. H.Boström: On the Metabolism of The Sulfate Group of Chondroitine Sulfuric Acid. J.of Biol.Chem.196,477/1952
11. H.Boström, B.Mansson: Über den enzymatischen Austausch der Sulfatgruppe der Chondroitinschwefelsäure in Scheiben von Knorpel. J.of Biol.Chem.196,483/1952
12. D.Dziewiatkowski: J.of Exp.Med.3,283/1954
13. R.C.Curran, T.Gibson: The Uptake of Labelled Sulfate by Human Cartilage and its Use as a Test for Viability. Proc.of Roy.Soc. (London), Series B, Vol.144(572)/1956
14. J.R.Penney, B.M.Balfour: J.of Path.61,171/1951
15. P.W.Kent, J.Jersey, L.M.Steddon, R.Oliver, J.Vaughan: Deposition of S 35 in Cortical Bone. Biochem.J. 62(3),470/1956
16. D.Dziewiatkowski: J.Exp.Med.93(451)/1951
17. L.L.Layton: Cancer(N.Y.)3,725/1950

18. L.L.Layton: In Vitro Sulfate Fixation by Granulation Tissue and Injured Muscle Tissue from Healing Wounds. Proc.Soc.Exp. Biol.a.Med. 73,570/1950
19. K.Schreier: Bedeutung radioaktiv markierter Verbindungen für die Erforschung des Eiweißstoffwechsels. Strahlentherapie 102(4), 1957
20. A.C.Upton: Utilization of S^{35} in Scorbutic Guinea-Pigs. Arch.of Path.62(3)194/1956
21. E.Kodicek, G.Loewi: Uptake of $S^{35}O_4$ by Mucopolysaccharides of Granulation Tissue. Proc.of Roy.Soc.(London) Series B Vol.144 (914),100/1955
22. G.Loewi, P.W.Kent: The Utilization of Inorganic Sulfate by Granulation Tissue. Biochem.J.65(3) 550/1957
23. H.Boström: Ark.Kemi.(Stockholm) 6,43/1957
24. H.Tarver, C.L.A.Schmidt: J.of Biol.Chem.130,67/1939
25. H.D.Cremer, G.Dittmann: Einbau von organischem und anorganischem Schwefel in Knorpel, Knochen und Zähne. Biochem.Zschr. Bd.327 (377)/1956
26. L.H.Smith; B.Anderson, T.T.Odell jr.: Bindung von S^{35} -markiertem Sulfat im Serum von Ratten. Studien mit Filterpapierelektrophorese. Proc.of the Soc.f.Exp.Biol.a.Med. 90(361)/1955
27. D.Dziewiatkowski, Nicola di Ferrante: Association of Sulfate- S^{35} with Serum Proteins in The Rat. J.Biol.Chem.227(347)/1957
28. R.C.Buck: Aufnahme von radioaktivem Sulfat durch Arterien von gesunden Kaninchen und solchen, die mit Cholesterin gefüttert wurden. J.of Histochem. 3(6),435/55
29. L.L.Layton: Cancer 2,1089/1949
30. E.W.Lewison, J.E.Levi, G.S.Jones jr., H.E.Silberstein: Radio-natriumöstronsulfat in Fällen von fortgeschrittenem Brustkrebs. Cancer 4(537)/1951
31. H.Domagalla, H.Ley: Untersuchungen zur Frage des Schwefelstoffwechsels bei Malignomkranken. Zschr.f.klin.Med.152(240)/1993
32. F.S.Hemett: Chemistry of Growth in its Bearing on Cancer. Acta med. URSS 2,(7)/1939, zit. nach Referat in Zschr.f.Krebsforschung 50(436)/1940
33. R.Perl: Versuche über die Plasmaclearance von S^{35} -markiertem d-l-Cystin bei Tumorkranken. Dissertation 1959

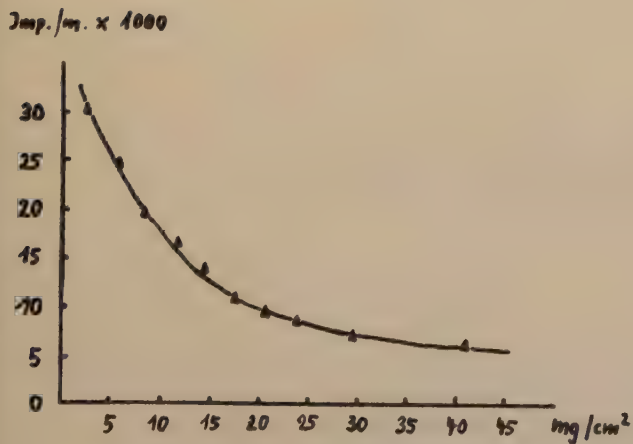
34. W.Maurer: Ergebnisse der medizinischen Grundlagenforschung mit radioaktiven Isotopen. Deutsch.Med.J., 8.Jhrg.S.324/1957
35. M.F.Levitt, M.Gaudino: Messung von Körperwasserräumen. Am.J.ofMed. 9,208/1950
36. R.H.Cardazo, S.Edelmann: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Raum als Mass der extracellulären Flüssigkeit. J.ofClin.Invest.31(280)/1952
37. M.Walser: Der Sulfatraum als Mass der extracellulären Körperflüssigkeit. Proc.of Soc.f.Exper.Biol.a.Med. 79,3(372)/1952
38. M.Walser, D.W.Seldin, A.Grollmann: Messung von Radiosulfat zur Bestimmung des Volumens der extracellulären Flüssigkeit bei Mensch und Hund. J.Clin.Invest. 32(299)/1953
39. R.Ryan, L.R.Pascal, T.Inoye, L.Bernstein: Versuche mit S^{35}O_4 zur Abschätzung von V(d) beim gesunden und kranken Menschen.⁴ J.Clin.Invest. 35,10(1119)/1956
40. G.v.Hevesy: Bedeutung der Radioaktiven Isotope für Medizin und Biologie. Strahlentherapie 102(3),341/1957
41. R.C.Gottschalk, H.C.Allen jr.: Uptake of S 35 by Chondrosarcomas in man. Proc.Soc.Exper.Biol.a.Med. 80(334)/1952
42. M.Masters: The Determination of Sulfur in Biological Material. Bioch.J.33(1313)/1939
43. E.Agren: Studies on Radioaktiv Sulphur S 35 precipitated as Bencidine-Sulphate. Acta Radiol. 48,Fasc.5/1957
44. Zitiert nach (30).
45. H.Schlüssel: S^{35} -Urinausscheidung nach Gabe von S^{35} -markierter Hefe (*torula utilis*) beim Menschen. Biochem.Zschr. 322 S.513/1952

A N H A N G

Eichkurven

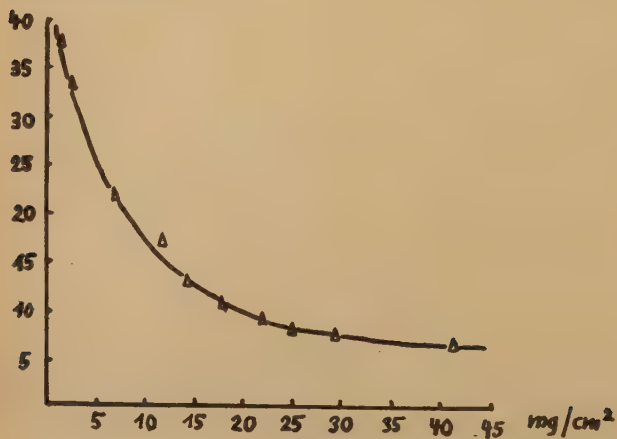


Selbstabsorptionskurve. Methode der unendlichen Schichtdicke.
Glasplättchenmethode (vgl.S.16)



Selbstabsorptionskurve zur Bestimmung eines Selbstabsorptions-
faktors für Schwefel als Bariumsulfat gefällt (vgl.S.22)

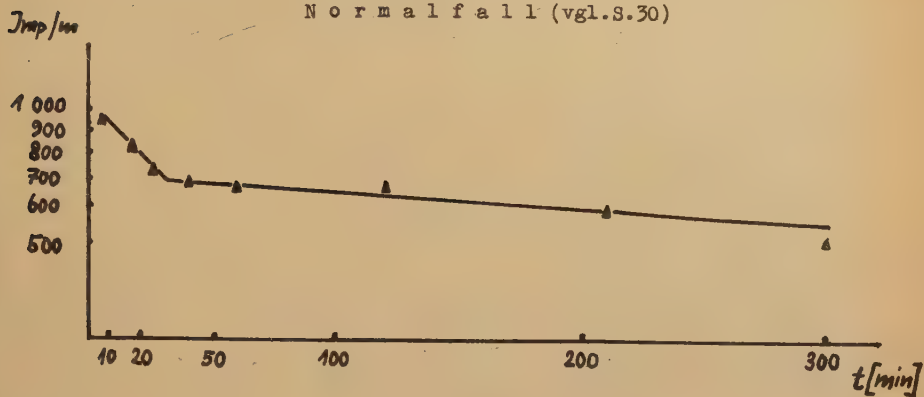
$I_{mp}/m \times 1000$



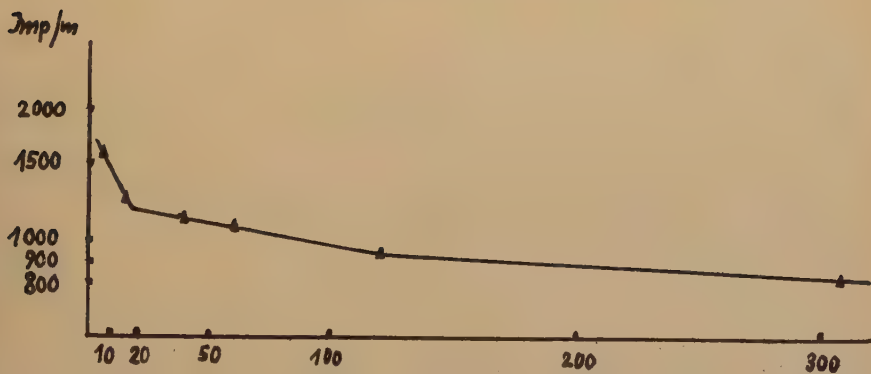
Selbstabsorptionskurve zur Bestimmung eines Selbstabsorptionsfaktors für Schwefel als Benzidinsulfat gefällt (vgl. S. 21)

Abfall der Serumaktivität beim Kaninchen

Normalfall (vgl. S. 30)

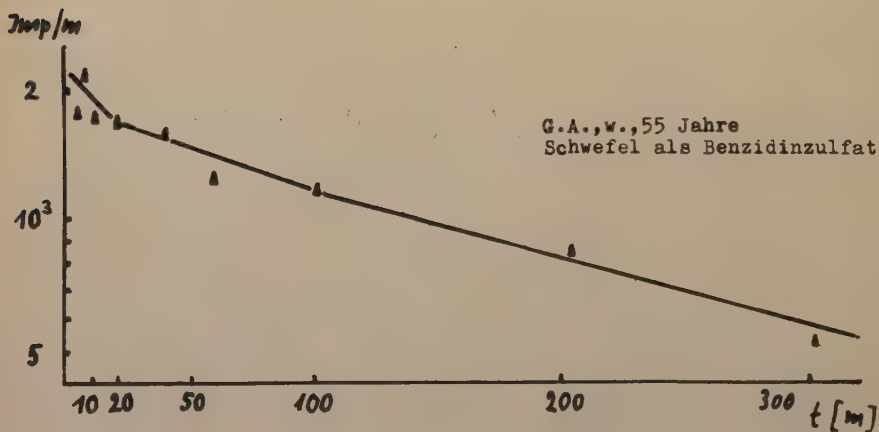
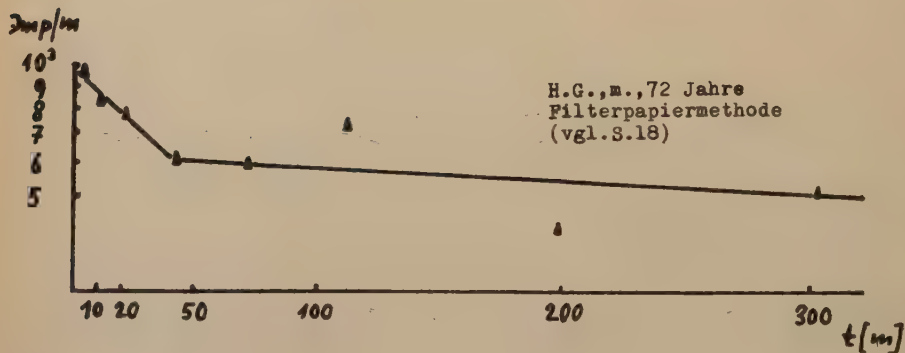
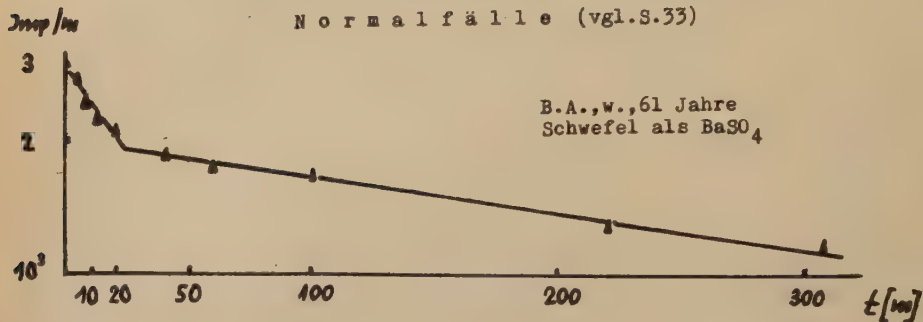


Brown-Pearce-Tumor (vgl. S. 30)



Abfall der Plasmaaktivität beim Menschen

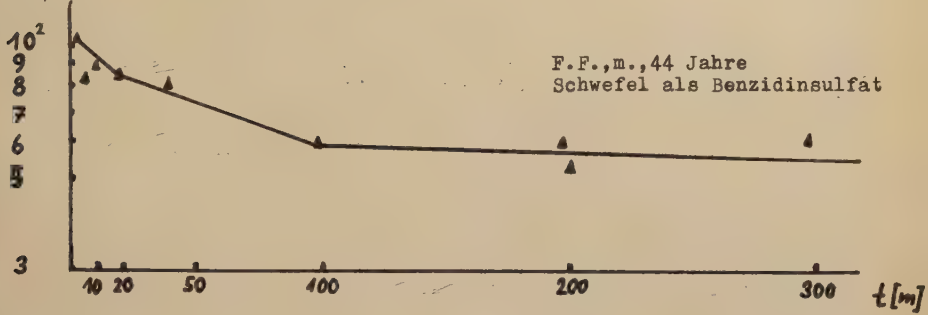
Normalfälle (vgl.S.33)



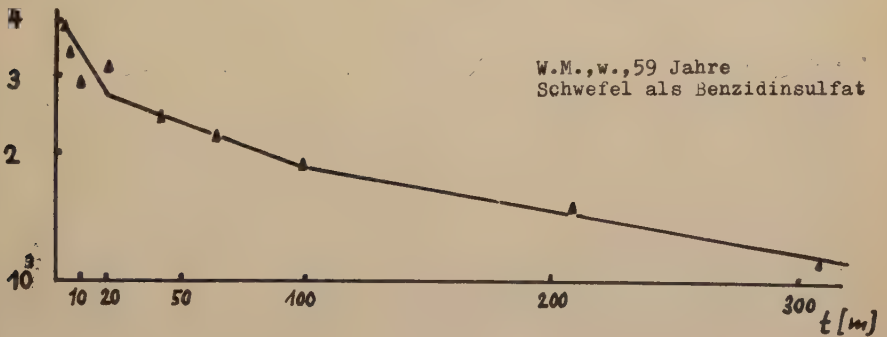
Abfall der Plasmaaktivität beim Menschen

Normalfälle

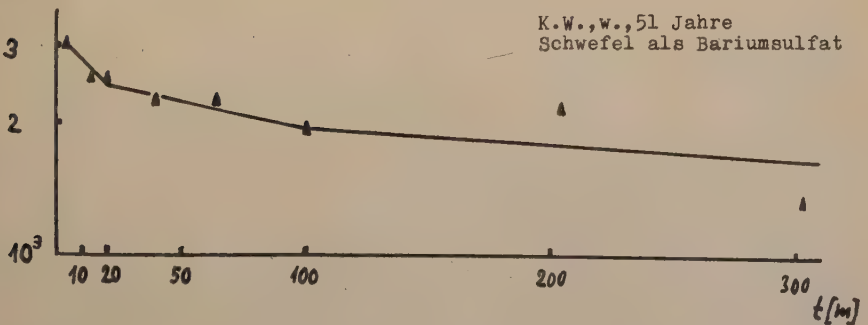
Imp./m



Imp./m

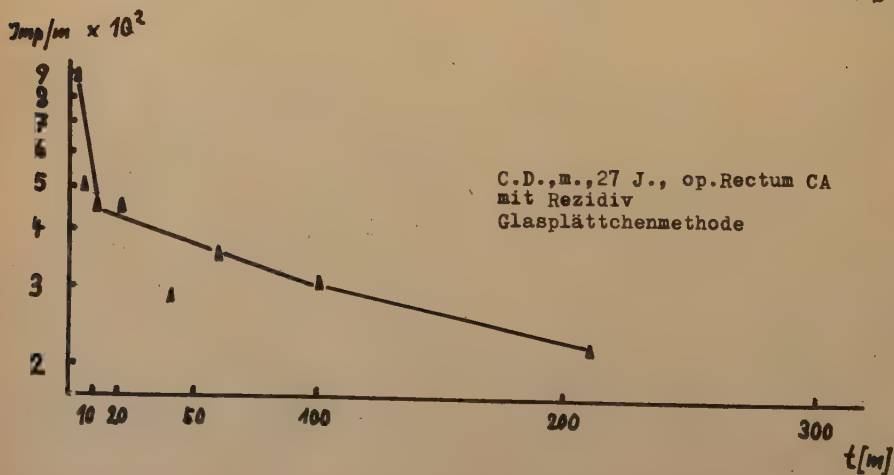
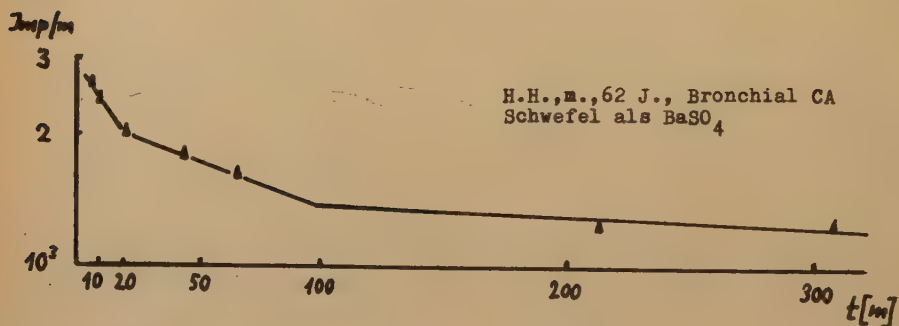
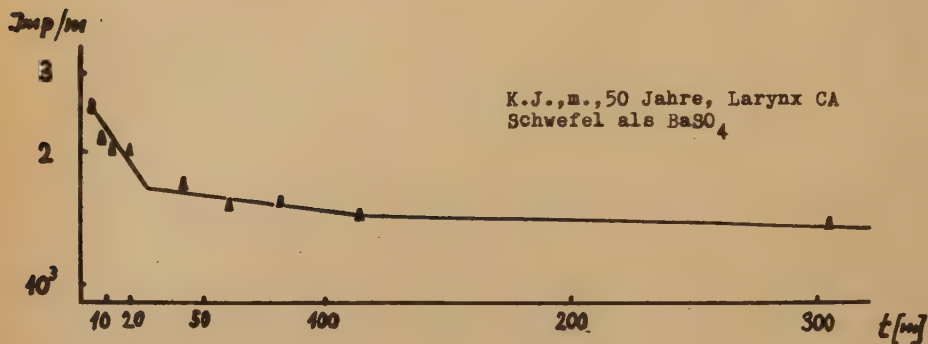


Imp./m



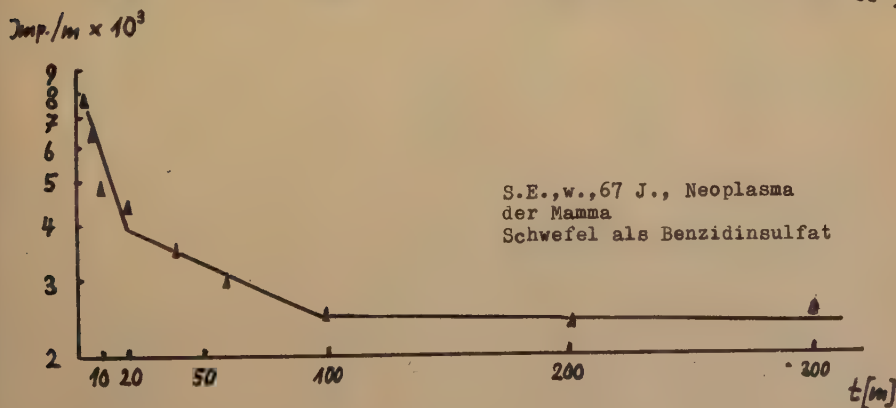
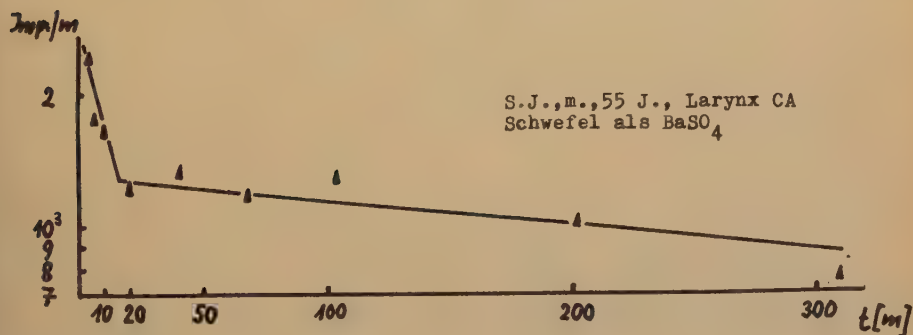
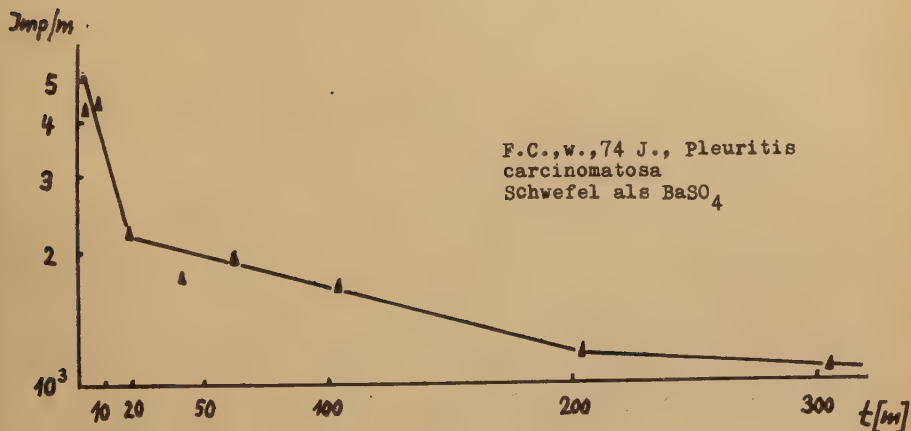
Abfall der Plasmaaktivität beim Menschen

Malignomkranke (vgl.S.34)



Abfall der Plasmaaktivität beim Menschen

Malignomkranke

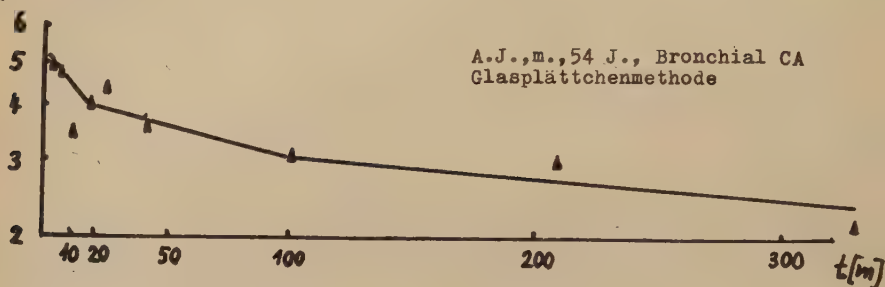


Abfall der Plasmaaktivität beim Menschen

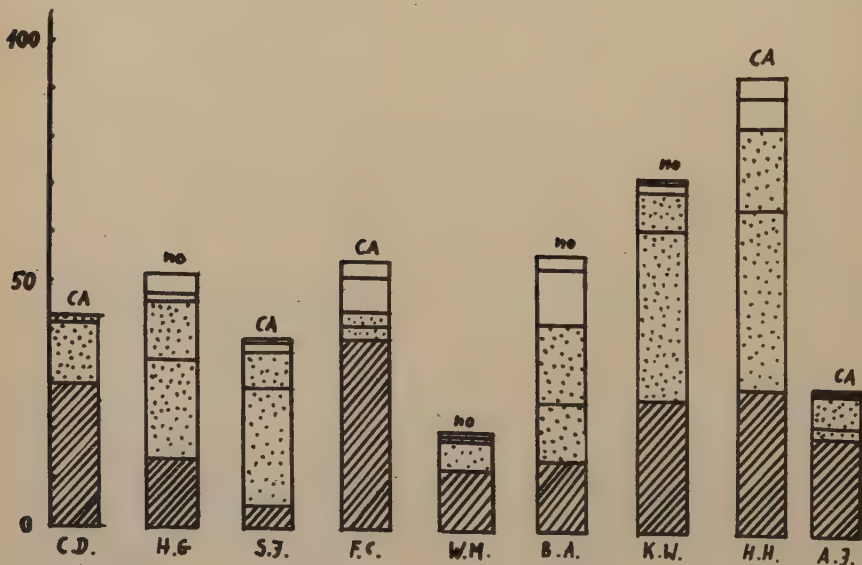
Malignomkranke

Imp./ml $\times 10^2$

A.-J., m., 54 J., Bronchial CA
Glasplättchenmethode



% injiz. Dosis



Urinausscheidung von S^{35} -markiertem Sulfat beim Menschen
 Aktivität in % der injizierten Dosis
 8, 24, 48, 72, 96=Std. Mengen
 CA = Carcinomfall, no= Normalfall

Lebenslauf.

Geboren am 2.V.30 in Nürnberg als Sohn des Volkswirtschaftlers Dr.rer.pol.Georg Bieber. 1936 Übersiedlung nach München. Hier Besuch des Theresiengymnasiums von 1940-1949. Nach dem Abitur einjähriger Studienaufenthalt in USA im Rahmen des deutsch-amerikanischen Austauschprogrammes mit Besuch der Thayer-Academy in Braintree, Massachusetts. Von 1950-1953 Studium der Physik, seit 1954 medizinisches Studium an der Universität München. Die ärztliche Vorprüfung wurde im Frühjahr 1956, das medizinische Staatsexamen von April bis Juli 1959 abgelegt.

Herrn Professor Dr. H. v. B r a u n b e h r e n s
bin ich für die Übernahme des Korreferates zu großem
Dank verpflichtet.

Herrn Oberarzt Dr. H. W. P a b s t möchte ich an die-
ser Stelle für die Überlassung des Arbeitsplatzes sowie
für die freundliche Beratung und Unterstützung bei der
Bewältigung der mannigfachen technischen Probleme, die
sich im Zusammenhang mit der technischen Durchführung
der Probleme ergaben, herzlichen Dank sagen.

Besonderen Dank schulde ich auch Fräulein Z i e g e n -
b a l g und Fräulein H o f m a n n für ihre Mitarbeit
bei der Vorbereitung der Versuche und der chemischen
Aufbereitung der Präparate sowie Fräulein Renate
S m o l k a für die Durchsicht und Niederschrift des
Manuskriptes.

Helmut Bieber

